

Charakterisierung von Methoden und Anwendungen der digitalholographischen Mikroskopie

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Physik

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Humboldt-Universität zu Berlin

von
Herr Dipl.-Phys. Daniel Carl
geboren am 13.02.1976 in Jena

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:
Prof. Dr. Hans Jürgen Prömel

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter:

- (i) PD Dr. habil. Günther Wernicke
- (ii) Prof. Dr. Beate Röder
- (iii) Prof. Dr. Klaus Hinsch

eingereicht am:	13. September 2005
Tag der mündlichen Prüfung:	19. Dezember 2005

Abstract

An off-axis setup for digital holographic microscopy in incident and transmission light arrangement for simultaneous high resolution full field amplitude and quantitative phase contrast microscopy is presented. Different kinds of algorithms for numerical reconstruction of the complex object wave are compared concerning their applicability to the microscopy arrangement. By combining a non-diffractive spatial phase shifting algorithm that performs reconstruction without the disturbing terms twin image and zero order with the numerical evaluation of the Fresnel-Kirchhoff diffraction integral by a convolution method we achieve best results. The simultaneous reconstruction of the object wave's amplitude and phase from a single hologram requires a mathematical model of the spatial phase distribution within the hologram plane. An efficient numerical algorithm has been developed for determining the model's parameters automatically and tested concerning its accuracy. Furthermore, the relation between the axial position of the object and the distance of reconstruction which is required for the quantitative evaluation of the reconstructed images and the application of a pure numerical focus is derived. Technical objects were used to quantify the lateral resolution and the phase resolution of the system and to optimize several parameters of the setup. Biological probes such as living cells are analyzed in transmission light arrangement. As a result the knowledge of the refractive index of the medium and the cell is required to derive the cell's thickness from the reconstructed phase. Thus a special experimental method for the approximation of the integral refractive index of single cells from the reconstructed phase has been developed. Finally results of cell differentiation by morphological varieties as well as results of stimulated dynamic morphological changes are presented and discussed.

Keywords:

digital holography, microscopy, interferometry, living cell analysis

Zusammenfassung

Es wird ein „off-axis“ Aufbau zur digitalholographischen Mikroskopie in Durchlicht- und Auflichtanordnung vorgestellt, der gleichzeitig hoch aufgelöste „full-field“ Amplituden- und quantitative Phasenkontrastmikroskopie ermöglicht. Dabei werden verschiedene Algorithmen zur numerischen Rekonstruktion der komplexen Objektwelle bzgl. ihrer Eignung für die mikroskopische Anordnung miteinander verglichen. Durch Kombination eines beugungsfreien räumlichen Phasenschiebeverfahrens, das die Rekonstruktion ohne „Twin-Image“ und nullte Beugungsordnung ermöglicht, und der Auswertung des Fresnel-Kirchhoff'schen Beugungsintegrals mit der Faltungsmethode werden die besten Ergebnisse erzielt. Die gleichzeitige Rekonstruktion der Amplitude und der Phase der Objektwelle aus einem einzigen Hologramm erfordert die mathematische Beschreibung der räumlichen Phasenverteilung in der Hologrammebene. Zur Bestimmung der Modellparameter wurde ein effizienter Algorithmus entwickelt und hinsichtlich seiner Genauigkeit getestet. Darüber hinaus wurde der Zusammenhang zwischen axialer Probenposition und dem Rekonstruktionsabstand, dessen Kenntnis zur quantitativen Auswertung und für eine rein numerische Fokussierung notwendig ist, hergeleitet. Anhand von Untersuchungen an technischen Objekten werden die laterale Auflösung und die Phasenauflösung des Systems quantifiziert und weitere experimentelle Parameter optimiert. Transparente biologische Proben, wie lebende Zellen, werden in Durchlichtanordnung analysiert. Dabei ist zur Bestimmung der Zelldicke die Kenntnis der Brechungsindizes von Zelle und Medium erforderlich. Hierfür wird ein experimentelles Verfahren vorgestellt, das die Abschätzung des integralen Brechungsindex von Einzelzellen anhand ihrer rekonstruierten räumlichen Phasenverteilung ermöglicht. Exemplarisch wird Zelldifferenzierung aufgrund morphologischer Eigenschaften nachgewiesen und es werden Ergebnisse dynamischer Untersuchungen an lebenden Zellen gezeigt und diskutiert.

Schlagwörter:

Digitale Holographie, Mikroskopie, Interferometrie, Lebendzellanalyse

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Motivation	1
2	Theoretische Grundlagen und Vorbetrachtungen	5
2.1	Grundlagen der digitalen Holographie	5
2.1.1	Hologrammaufzeichnung und Diskretisierung	5
2.1.2	Beugungstheorie	7
2.1.3	Speckle	13
2.2	Diffraktive Rekonstruktionsverfahren	14
2.2.1	Diskrete Fresneltransformation (DFT)	15
2.2.2	Faltungsmethode (CVM)	18
2.3	Auflösung optischer Systeme zur digitalholographischen Mikro- skopie	20
2.4	Nicht diffraktive Rekonstruktionsverfahren	22
2.4.1	Phasenschiebungsverfahren	22
2.4.2	Räumliche Phasenverteilung in der Hologrammebene . . .	23
2.4.3	Rekonstruktion im Ortsraum mit NDRM	26
2.4.4	Fouriertransformationsmethode (FTM)	29
2.4.5	Kombination mit diffraktiven Verfahren	35
2.5	Zusammenhang zwischen Objektebenenabstand und Rekonstruk- tionsabstand	35
2.5.1	Direkte Rekonstruktion	36
2.5.2	Einfluss eines abbildenden Systems auf die „Image“-Größe	37
2.5.3	Propagation der komplexen Objektwelle	39
3	Experimentelle Methoden	41
3.1	Experimenteller Aufbau zur digitalholographischen Mikroskopie .	41
3.1.1	Durchlichtanordnung zur digitalholographischen Mikro- skopie	41
3.1.2	Auflichtanordnung zur digitalholographischen Mikroskopie	43
3.1.3	Digitalisierung der Hologramme	45
3.2	Weiterverarbeitung der rekonstruierten komplexen Objektwelle .	45
3.3	Tiefpassfilterung von Phasenverteilungen	47
3.4	Entfalten von Phasenverteilungen	48

INHALTSVERZEICHNIS

3.5	Anpassen der Rekonstruktionsparameter	49
3.5.1	Bestimmung von Näherungswerten	50
3.5.2	Optimierung der Rekonstruktionsparameter	52
4	Ergebnisse und Diskussion	57
4.1	Vergleich der Rekonstruktionsmethoden	57
4.1.1	Direkte Rekonstruktion mit DFT und CVM	57
4.1.2	Rekonstruktion in der Hologrammebene mit NDRM und eFTM	59
4.1.3	Propagation der komplexen Objektwelle mit DFT und CVM	63
4.1.4	Abbildungsfehler bei der Propagation	66
4.1.5	Diskussion der Ergebnisse und Auswahl der Rekonstruktionsmethode	67
4.2	Automatisiertes Anpassen der Rekonstruktionsparameter für die NDRM	70
4.2.1	Bestimmung von Näherungswerten	70
4.2.2	Numerische Optimierung der Parameter	72
4.2.3	Anwendung auf experimentelle Daten	75
4.2.4	Diskussion des Verfahrens zum Anpassen der Parameter .	79
4.3	Systemcharakterisierung und Optimierung	81
4.3.1	Anpassung der „off-axis“ Geometrie	81
4.3.2	Optimierung der Objektbeleuchtung	84
4.3.3	Experimentelle Überprüfung des Zusammenhangs zwischen Objektebenenabstand und Rekonstruktionsabstand .	87
4.3.4	Laterale Auflösung und Schärfentiefe	89
4.3.5	Phasenauflösung	91
4.3.6	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse zur Systemcharakterisierung und -optimierung	95
4.4	Anwendung des Verfahrens an biologischen Objekten	97
4.4.1	Holographisch „erweiterte“ Schärfentiefe	97
4.4.2	Zellkulturmodell PaTu 8988	100
4.4.3	Abschätzung des Brechungsindex von PaTu 8988 Zellen .	101
4.4.4	Untersuchung morphologischer Veränderungen von PaTu 8988T Zellen durch Expression von E-Cadherin	104
4.4.5	Dynamische Verformungsmessung an PaTu 8988S Zellen	106
4.4.6	Diskussion der Ergebnisse an biologischen Proben	107
4.5	Aufgebaute Demonstratorsysteme	109
5	Einordnung des Verfahrens, Schlussfolgerungen und Ausblick	113
6	Zusammenfassung	118

INHALTSVERZEICHNIS

A Anhang	120
A.1 Technische Daten	120
A.2 Beschreibung der Software	124
Literaturverzeichnis	128
Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge	137
Abkürzungsverzeichnis	139

1 Einleitung und Motivation

Die Holographie wurde erstmalig 1948 von Gabor als neues linsenloses bildgebendes Verfahren zur Rekonstruktion von Wellenfronten vorgestellt [1]. Das ursprüngliche Ziel des holographischen Prinzips war die Vermeidung von Aberrationen bei der Elektronenmikroskopie, wo das Verfahren jedoch aufgrund ungelöster technischer Probleme bis heute nicht zum Einsatz gekommen ist. Der Durchbruch der Holographie kam erst mit der Entwicklung des Lasers als leistungsstarke kohärente Lichtquelle im Jahr 1960. In der von Gabor vorgestellten „in-line“ Anordnung, bei der sich Objekt- und Referenzwelle in der gleichen Richtung ausbreiten, wird die rekonstruierte Objektwellenfront von der ebenfalls rekonstruierten nullten Beugungsordnung und der komplex konjugierten Wellenfront (virtuelles Bild) überlagert. Durch Verkippen der Referenzwelle aus der optischen Achse („off-axis“ Anordnung) wurde die Voraussetzung für eine räumliche Trennung des reellen Bildes, der nullten Beugungsordnung und des virtuellen Bildes geschaffen [2, 3, 4]. Hierdurch erhielt die optische Holographie großen Vortrieb, u. a. wurde 1965 durch Stetson und Powell die holographische Interferometrie entdeckt [5].

Die Palette der für die Aufzeichnung von Hologrammen eingesetzten Medien reicht von herkömmlichen photographischen Materialien, in denen das Hologramm irreversibel gespeichert wird, bis hin zu den als reversiblen Speicher einsetzbaren photorefraktiven Kristallen und Polymeren. Für weiterführende Darstellungen zu analogen Aufzeichnungsmedien und die damit verbundenen holographischen Techniken wird auf die Literatur verwiesen, z. B. [6, 7, 8, 9, 10].

Bei der digitalen Holographie werden zur Aufzeichnung der holographischen Informationen Halbleiterelemente verwendet, die die Intensität des einfallenden Lichts in ein elektrisches Signal umwandeln, das anschließend diskretisiert und zur digitalen Weiterverarbeitung im Computer gespeichert wird. In der Regel werden hierzu CCD-Sensoren (engl. „Charge Coupled Device“) eingesetzt, die eine schnelle (Videowiederholrate und darüber hinaus) und reversible Aufzeichnung ermöglichen [11]. Die durch den Pixelabstand (derzeit $\approx 5 \mu\text{m}$) begrenzte laterale Auflösung, die um Größenordnungen geringer als die analoger holographischer Aufzeichnungsmedien ist, kann jedoch durch den Einsatz von Mikroskopobjektiven verbessert werden [12]. Damit ist eine Steigerung der lateralen Auflösung bis hin zur Beugungsbegrenzung, die durch das optische System gegeben ist,

möglich [13]. Der betrachtete Bildausschnitt verkleinert sich durch die optische Vergrößerung der Objektwelle entsprechend, da die Anzahl der mit dem CCD-Sensor speicherbaren Bildinformationen konstant bleibt. Mit Hilfe der erzielten mikroskopischen Auflösung konnte die digitalholographische Mikroskopie bereits erfolgreich zur Untersuchung lebender Zellen eingesetzt werden [14, 15, 16].

Auch bei der digitalen Holographie wird zwischen „in-line“ und „off-axis“ Geometrie unterschieden. Die „in-line“ Anordnung entspricht dabei im Wesentlichen der ursprünglichen von Gabor vorgeschlagenen Anordnung, d. h. Objekt- und Referenzwelle propagieren in Richtung der optischen Achse. Wie bei der optischen Rekonstruktion der Objektwelle aus „in-line“ Hologrammen tritt auch bei der numerischen Rekonstruktion das Problem auf, dass Objektwelle, nullte Beugungsordnung und komplex konjugierte Objektwelle räumlich überlagert rekonstruiert werden. In der digitalen Holographie wird die rekonstruierte Objektwelle, das reelle Bild, oft als „Image“ bezeichnet, während die komplex konjugierte Objektwelle, das virtuelle Bild, „Twin-Image“ genannt wird. Lösungsansätze für die Trennung von nullter Beugungsordnung, „Twin-Image“ und „Image“ bei der digitalen „in-line“ Holographie werden in der Literatur, z. B. in [17, 18, 19, 20, 21, 22, 23], beschrieben. Die dabei verwendeten numerischen Methoden sind im Vergleich zu den bei der digitalen „off-axis“ Holographie verwendeten Algorithmen rechnerisch aufwendiger.

In der Literatur wird die Rekonstruktion der Objektwelle aus digitalen „off-axis“ Hologrammen häufig durch numerische Auswertung des Fresnel-Kirchhoffschen Beugungsintegrals mit diskreter Fresneltransformation [11] oder der Faltungsmethode [24] beschrieben. Die Methoden unterscheiden sich vor allem dadurch, dass bei der diskreten Fresneltransformation eine Koordinatentransformation stattfindet, so dass die Pixelauflösung vom Rekonstruktionsabstand abhängt. Bei der Faltungsmethode bleibt das Sampling-Intervall stattdessen konstant. Des Weiteren unterscheiden sich die Methoden dadurch, dass die rekonstruierte Objektwelle bei der Fresneltransformation unterhalb eines bestimmten Rekonstruktionsabstandes von Aliasing-Effekten überlagert wird, während dieser Effekt bei der Faltungsmethode oberhalb dieses Abstandes auftritt [25, 26, 27, 28].

Ein von der numerischen Auswertung des Fresnel-Kirchhoffschen Beugungsintegrals verschiedener Ansatz zur Rekonstruktion besteht darin, die komplexe Objektwelle in einem ersten Schritt in der Hologrammebene durch Lösen der Interferogrammgleichung zu berechnen, so dass nullte Beugungsordnung und „Twin-Image“ nicht mit rekonstruiert werden. Weitere Bildebenen, die parallel zur Hologrammebene liegen, können dann durch Propagation der komplexen Wellenfront, z. B. mit diskreter Fresneltransformation rekonstruiert werden [16, 29]. Die Rekonstruktion der komplexen Objektwelle im Ortsraum ist mit der Berechnung

der räumlichen Phasenverteilung bei der ESPI (engl. „Electronic Speckle Pattern Interferometry“) mit räumlichen Phasenschiebungsverfahren vergleichbar und wird in der Literatur auch als „Bildebenenholographie“ (engl. „Image Plane Holography“) bezeichnet [30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37].

Im Gegensatz zu der in Medizin und Biologie etablierten Phasenkontrastmikroskopie, die hauptsächlich zur qualitativen Darstellung transparenter Objekte, wie lebender Zellen, eingesetzt wird, wird bei der digitalen Holographie direkt die räumliche Verteilung der Phase der Objektwelle rekonstruiert.

Verfahren wie die 1935 von Zernike entwickelte Phasenkontrastmikroskopie [38] oder des 1950 von Nomarski entwickelten Differentiellen Interferenzkontrasts (engl. „Differential Interference Contrast“, kurz: DIC) [39] können diese Information nicht direkt liefern, so dass sie z. B. für eine Topographiemessung ungeeignet sind. Bei der Phasenkontrastmikroskopie werden die aufgezeichneten Bilder von zwei optischen Artefakten überlagert, die als „halo“ und „shading-off“ Effekt bezeichnet werden. Eine quantitative Auswertung von DIC-Aufnahmen, bei denen der Kontrast vom Gradienten der räumlichen Phasenverteilung abhängt, ist prinzipiell möglich, aber mit großem Aufwand bei der Bildaufnahme und der anschließenden Signalverarbeitung verbunden [40].

Bei der mittlerweile in Biologie und Medizin etablierten Fluoreszenzmikroskopie müssen in der Regel sog. Marker zur Kontrastverbesserung eingesetzt werden, da die Autofluoreszenz der Zellen meist nicht ausreicht. Ein Vorteil der Fluoreszenzmarker besteht darin, dass diese oft spezifisch binden und damit zusätzliche funktionelle Informationen über die Zelle liefern. Nachteile sind jedoch zum einen lange Belichtungszeiten (bis in den Sekunden-Bereich) und zum anderen eine oft ungewollte Beeinflussung der Zelle durch den Marker (nicht minimal invasiv).

Bei der konfokalen Mikroskopie, die 1957 von M. Minsky erfunden wurde [41, 42], ist eine Auflösung, die ca. um den Faktor Zwei besser als die Beugungsbegrenzung ist, möglich. Dazu wird ein möglichst kleiner Fleck des Präparates beleuchtet. Das Bild des beleuchteten Flecks wird in der Zwischenbildebene durch eine sehr kleine Blende (Pinhole) geführt. Das hat zur Folge, dass nur Licht aus der Fokusebene den Detektor (z. B. Photomultiplier) erreicht und alle anderen (unscharfen) Ebenen ausgeblendet werden. Durch dreidimensionales Abtastern der Probe wird daraus ein Bild zusammengesetzt. Das Verfahren kann nur in Auflichtanordnung angewendet werden und hat insbesondere die Fluoreszenzmikroskopie in der Biologie revolutioniert [43].

Scannende taktile Verfahren, wie AFM (engl. „Atomic Force Microscopy“) [44], die eine 3D-Auflösung von Oberflächen von wenigen Nanometern erreichen, haben in den letzten Jahren auch in der Zellbiologie zunehmend an Be-

deutung gewonnen. Nachteile sind die begrenzte Zeitauflösung und die in z -Richtung auf wenige Mikrometer begrenzte Dynamik. Weiterhin kann eine Beeinflussung der Probe durch die Abtastspitze nicht ausgeschlossen werden. Bei der Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM) wird eine Auflösung im Nanometer-Bereich erzielt. Durch eine schräge Positionierung der Probe und die große Schärfentiefe wirken die REM-Aufnahmen oft dreidimensional. Eine quantitative 3D-Auswertung ist dagegen nur mit Stereo-REM und zusätzlicher Bildverarbeitung möglich. Wesentliche Nachteile des Verfahrens sind, dass es nicht an lebenden Zellen eingesetzt werden kann, da die Messungen im Hochvakuum stattfinden, wofür die Proben sehr aufwendig präpariert werden müssen (fixieren, trocknen und metallisch bedampfen) [45].

Im Gegensatz zu den genannten in Biologie und Medizin etablierten Verfahren stellt die digitalholographische Mikroskopie eine gleichzeitig hochauflösende dreidimensionale markerfreie minimal invasive Analyse von lebenden Zellen in Aussicht. Deshalb ist das Ziel dieser Arbeit der Aufbau, die Optimierung und die Charakterisierung eines digitalholographischen Mikroskopiesystems, das insbesondere zur Untersuchung von lebenden Zellen eingesetzt werden soll. Zunächst wird ein experimenteller Aufbau zur digitalen Holographie mit mikroskopischer Abbildungsoptik in Durchlicht- und Auflichtanordnung realisiert, so dass Untersuchungen an transparenten und reflektiven Objekten möglich sind. Es werden verschiedene Algorithmen zur Rekonstruktion digitaler „off-axis“ Hologramme miteinander verglichen und anschließend der für die mikroskopische Anwendung geeignetste ausgewählt. Für die Rekonstruktion der komplexen Objektwelle (Amplitude und Phase) aus jeweils nur einem einzigen Hologramm ist eine Beschreibung der räumlichen Phasenverteilung in der Hologrammebene durch ein mathematisches Modell erforderlich, dessen freie Parameter an die Geometrie des experimentellen Mikroskopieaufbaus angepasst werden müssen. Hierfür wird ein automatisiertes numerisches Verfahren entwickelt und anhand von Simulationen und experimentellen Daten bzgl. Genauigkeit und Reproduzierbarkeit untersucht. Weiterhin wird der für das experimentelle Arbeiten und eine quantitative Auswertung wichtige Zusammenhang zwischen Objektabstand und Rekonstruktionsabstand hergeleitet und anhand von Messungen überprüft. Anschließend erfolgt die Optimierung und Charakterisierung des Gesamtsystems. Schließlich wird die Anwendung des optimierten Verfahrens an verschiedenen biologischen Proben, u. a. an lebenden Zellen, demonstriert und diskutiert.

2 Theoretische Grundlagen und Vorbetrachtungen

In diesem Abschnitt werden die theoretischen Grundlagen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten experimentellen Untersuchungen erläutert. Nach einer kurzen Darstellung der Grundlagen der digitalen Holographie werden verschiedene Methoden zur numerischen Rekonstruktion der komplexen Objektwelle vorgestellt. Dabei wird besonders auf die Rekonstruktion in der Hologrammebene eingegangen. Es werden zwei alternative Methoden vorgestellt, die sich dadurch unterscheiden, dass die Rekonstruktion im Ortsraum bzw. im Frequenzraum durchgeführt wird. Weiterhin wird erläutert, wie durch Propagation der komplexen Objektwelle weitere Objektebenen rekonstruiert werden können. Schließlich erfolgt die Herleitung des für die in Kapitel 4 beschriebenen experimentellen Arbeiten und deren quantitative Auswertung wichtigen Zusammenhangs zwischen Objektebenenabstand und Rekonstruktionsabstand für die vorgestellten Rekonstruktionsalgorithmen.

2.1 Grundlagen der digitalen Holographie

2.1.1 Hologrammaufzeichnung und Diskretisierung

Um ein Objekt holographisch aufzuzeichnen wird es mit kohärentem Licht be- oder durchleuchtet. Durch die kohärente Überlagerung des am Objekt gebeugten Lichts O mit einer Referenzwelle R entsteht das durch Gleichung 2.1 beschriebene Interferogramm mit der räumlichen Intensitätsverteilung $I_H(x, y)$. Dabei werden die Ortsabhängigkeiten von O und R für eine einfache Notation vernachlässigt. Komplex konjugierte Wellen werden mit $*$ gekennzeichnet.

$$I_H(x, y) = |R|^2 + |O|^2 + R^*O + RO^* \quad (2.1)$$

In der Regel werden zur Aufzeichnung von digitalen Hologrammen CCD-

Sensoren eingesetzt, die sich besonders durch ihre lineare Kennlinie¹ auszeichnen. Die Belichtungszeit wird so gewählt, dass der Dynamikbereich des CCD-Sensors möglichst voll ausgenutzt und nicht übersteuert wird. Dieser Fall ist mit einem analog aufgezeichneten reinen Amplitudenhologramm mit linearer Kennlinie des holographischen Films vergleichbar. Dabei ergibt sich für den reellen Amplitudentransmissionsgrad:

$$\begin{aligned} T(x, y) &= a - bI_H(x, y)t_B \\ &= a - bt_B(RR^* + OO^* + R^*O + RO^*). \end{aligned} \quad (2.2)$$

Bei der optischen Rekonstruktion der Objektwelle wird das Hologramm mit der zur Aufzeichnung verwendeten Referenzwelle beleuchtet, so dass die Referenzwelle mit dem reellen Transmissionsgrad $T(x, y) = a - bt_B$ (reines Amplitudenhologramm) moduliert wird. Die Koeffizienten a und b beschreiben die Eigenschaften des Fotomaterials im linearen Bereich der Kennlinie, t_B ist die Belichtungszeit der Hologrammaufnahme. Bei einem reinen Amplitudenhologramm ergibt sich für die komplexe räumliche Amplitudenverteilung hinter der Hologrammebene:

$$\begin{aligned} E(x, y) &= T(x, y)R \\ &= aR - bt_BR(RR^* + OO^* + R^*O + RO^*). \end{aligned} \quad (2.3)$$

Dabei entstehen durch die Modulation der Referenzwelle vier Terme, die folgende Bedeutung haben:

1. $(a - bt_B|R|^2)R \sim R$ Nullte Beugungsordnung,
2. $bt_B|O|^2R$ verbreiterte nullte Beugungsordnung,
3. $bt_B|R|^2O \sim O$ virtuelles Bild,
4. $bt_BR^2O^*$ reelles Bild.

Der dritte Term entspricht bis auf einen bei der Rekonstruktion mit einer ebenen Welle konstanten Faktor der ursprünglich aufgezeichneten Objektwelle O . Die räumliche Trennung der vier Terme, die Gabor ursprünglich noch Probleme bereitete, da er nur sehr kurzkohärente Lichtquellen zur Verfügung hatte und damit nur „in-line“ Hologramme aufzeichnen konnte, wird durch einen Winkel zwischen Objekt- und Referenzwelle realisiert und als „off-axis“ Anordnung bezeichnet [47].

¹Durch die Wechselwirkung von Photonen mit Silizium werden in CCD-Sensoren Photoelektronen generiert, die in MOS-Kondensatoren oder in der Sperrschicht-Kapazität der Photodioden, die als Pixel fungieren, gespeichert werden. Die Anzahl der Photonen ist direkt proportional zur Belichtung. Zum Auslesen des Arrays werden die Ladungen sequentiell zu einem Ausleseknotten transportiert, wo sie in eine dazu proportionale Spannung umgewandelt werden. Die lineare Kennlinie resultiert aus der Linearität der Ladungsanhäufung und des Umwandlungsprozesses [46].

Durch die Interferenz zweier kohärenter Wellen mit den räumlichen Intensitätsverteilungen $I_O(x, y)$ und $I_R(x, y)$ entsteht die räumliche Intensitätsverteilung $I_H(x, y)$, die mathematisch durch die *Interferogrammgleichung* beschrieben wird:

$$I_H(x, y) = I_O(x, y) + \gamma_0(x, y) \cos(\varphi(x, y)). \quad (2.4)$$

Dabei ist die Untergrundintensität durch $I_0(x, y) = I_O(x, y) + I_R(x, y)$, der Modulationsgrad durch $\gamma_0(x, y) = 2\sqrt{I_O(x, y)I_R(x, y)}$ und die Phasendifferenz zwischen Objekt- und Referenzwelle durch $\varphi(x, y)$ gegeben.

Bei der Digitalisierung eines Hologramms, z. B. durch die Aufzeichnung mit einem CCD-Sensor, wird die kontinuierliche Intensitätsverteilung $I_H(x, y)$ diskretisiert. Da die einzelnen Detektorelemente (Pixel) eine endliche Ausdehnung besitzen, erfolgt bei der Diskretisierung gleichzeitig eine Integration über die lichtempfindliche Fläche jedes Pixels. Im Fall eines von Pixel zu Pixel näherungsweise konstanten räumlichen Phasengradienten $\Delta\alpha$, wie er sich bei der „off-axis“ Holographie ergibt, ist die diskrete Intensitätsverteilung auf dem Sensor gegeben durch [48]:

$$I_H(k, l) = I_0(k, l) + \text{sinc}\left(\frac{\Delta\alpha}{2}\right) \gamma_0(k, l) \cos(\varphi(k, l)). \quad (2.5)$$

Der Sinc-Term beschreibt die Integration über die räumliche Intensitätsverteilung im Winkelbereich $\Delta\alpha$, die abhängig von der Größe der lichtempfindlichen Fläche des Pixels und des Phasengradienten eine Abnahme der Modulation zur Folge hat:

$$\gamma(k, l) = \gamma_0(k, l) \text{sinc}\left(\frac{\Delta\alpha}{2}\right). \quad (2.6)$$

2.1.2 Beugungstheorie

2.1.2.1 Das Huygens-Fresnel-Prinzip in kartesischen Koordinaten

Die mathematischen Grundlagen der Holographie bauen auf dem Modell der Ausbreitung von Licht als Welle auf. Bei der Propagation von Lichtwellen müssen demnach Beugungseffekte berücksichtigt werden. Gleichung 2.7 beschreibt das Huygens-Fresnel-Prinzip gemäß der ersten Rayleigh-Sommerfeld-Lösung in kartesischen Koordinaten. Es besagt, dass jeder Punkt einer Elementarwelle ein Streuzentrum ist, von dem wieder eine Kugelwelle ausgeht. Die Überlagerung

aller sphärischen Wellen ergibt eine neue Wellenfront [49]. Für eine detaillierte Beschreibung der skalaren Beugungstheorie und die Herleitung von Gleichung 2.7 aus der Green'schen Funktion wird auf [50] verwiesen.

$$\Psi_z(\xi, \eta) = \frac{1}{i\lambda} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \Psi_0(x, y) \frac{\exp\left(\frac{i2\pi R}{\lambda}\right)}{R} \cos \theta \, dx dy \quad (2.7)$$

mit

$$R = \sqrt{(\xi - x)^2 + (\eta - y)^2 + z^2} \quad (2.8)$$

Die komplexe Amplitude $\Psi_z(\xi, \eta)$ eines Punktes B in der ξ, η -Ebene ergibt sich durch die Überlagerung aller von der x, y -Ebene ausgehenden Elementarwellen mit den komplexen Amplituden $\Psi_0(x, y)$ und der Wellenlänge λ . In Abbildung 2.1 sind die zugehörigen geometrischen Beziehungen veranschaulicht. Die x, y -Ebene mit $z = 0$ wird im Folgenden auch als Hologrammebene bezeichnet. In dieser Ebene wird der zur Hologrammaufzeichnung verwendete Sensor platziert.

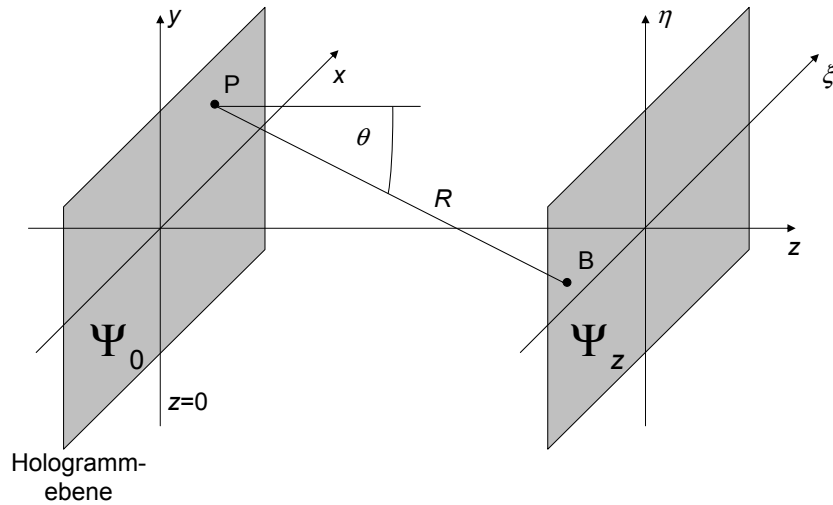


Abbildung 2.1: Geometrie bei der Ausbreitung eines komplexen Wellenfeldes $\Psi_0(x, y)$ in z -Richtung in kartesischen Koordinaten.

Zur weiteren Vereinfachung wird der als *Neigungsfaktor* bezeichnete Term in Gleichung 2.7 durch $\cos \theta = z/R$ ersetzt und es ergibt sich:

$$\Psi_z(\xi, \eta) = \frac{z}{i\lambda} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \Psi_0(x, y) \frac{\exp\left(\frac{i2\pi R}{\lambda}\right)}{R^2} dx dy. \quad (2.9)$$

Gleichung 2.9 enthält nur die der skalaren Beugungstheorie inhärenten Näherungen. Dabei wird Licht als skalare Größe behandelt und der fundamentale vektorielle Charakter des elektromagnetischen Feldes vernachlässigt. Die elektrischen und magnetischen Feldkomponenten, die an Grenzflächen durch die Maxwell'schen Gleichungen gekoppelt sind, können so unabhängig voneinander behandelt werden. Die skalare Beugungstheorie liefert sehr gute Ergebnisse, solange zwei Voraussetzungen erfüllt sind: (1) Die beugenden Strukturen müssen größer als die Wellenlänge der Strahlung sein und (2) das gebeugte Feld darf nicht zu nah an der Apertur ($z \gg \lambda$) beobachtet werden [50].

2.1.2.2 Die Fresnel-Approximation

Für die numerische Auswertung des Integrals 2.9 ist eine weitere Näherung notwendig, die als *Fresnel-Approximation* bezeichnet wird. Hierzu wird der durch Gleichung 2.8 in kartesischen Koordinaten gegebene Abstand R im Argument der Exponentialfunktion in Gleichung 2.9 durch die ersten beiden Terme und R^2 im Nenner durch den ersten Term der Taylor-Reihe: $\sqrt{1-b} = 1 + \frac{1}{2}b - \frac{1}{8}b^2 + \dots$ ersetzt. Das entspricht einer parabolischen Näherung für die von der Hologrammebene ausgehenden sphärischen Wellen.

$$\begin{aligned} R &= z \sqrt{1 + \left(\frac{\xi - x}{z}\right)^2 + \left(\frac{\eta - y}{z}\right)^2} \\ &\approx z \left(1 + \frac{1}{2} \left(\frac{\xi - x}{z}\right)^2 + \frac{1}{2} \left(\frac{\eta - y}{z}\right)^2\right). \end{aligned} \quad (2.10)$$

Damit ergibt sich als Ausdruck für das Feld am Ort (ξ, η) :

$$\begin{aligned} \Psi_z(\xi, \eta) &= \frac{\exp\left(i\frac{2\pi z}{\lambda}\right)}{i\lambda z} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \Psi_0(x, y) \times \\ &\quad \exp\left(i\frac{\pi}{\lambda z} (\xi - x)^2 + (\eta - y)^2\right) dx dy. \end{aligned} \quad (2.11)$$

Gleichung 2.11 entspricht mathematisch einer Faltung:

$$\Psi_z(\xi, \eta) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \Psi_0(x, y) h(\xi - x, \eta - y) dx dy \quad (2.12)$$

mit der auch als *Impulsantwort* bezeichneten Funktion:

$$h(\xi, \eta) = \frac{\exp\left(i\frac{2\pi z}{\lambda}\right)}{i\lambda z} \exp\left(i\frac{\pi}{\lambda z} (\xi^2 + \eta^2)\right). \quad (2.13)$$

Durch Faktorisierung des Terms $\exp\left(i\frac{\pi}{\lambda z}(\xi^2 + \eta^2)\right)$ und unter Berücksichtigung der Koordinatentransformation [25]:

$$\xi = \frac{x}{\lambda z} \quad \text{und} \quad \eta = \frac{y}{\lambda z} \quad (2.14)$$

kann Gleichung 2.11 in eine weitere Darstellung überführt werden:

$$\begin{aligned} \Psi_z(\xi, \eta) = & \frac{\exp\left(i\frac{2\pi z}{\lambda}\right)}{i\lambda z} \exp\left(i\pi\lambda z(\xi^2 + \eta^2)\right) \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \Psi_0(x, y) \times \\ & \underline{\exp\left(i\frac{\pi}{\lambda z}(x^2 + y^2)\right) \exp(-i2\pi(x\xi + y\eta)) dx dy}. \end{aligned} \quad (2.15)$$

Gleichung 2.15 entspricht einer Fouriertransformation des Produktes (unterstrichen dargestellt) aus dem komplexen Feld $\Psi_0(x, y)$ mit einem komplexen quadratischen Exponentialfaktor.

Die durch die Gleichungen 2.11 und 2.15 gegebenen zueinander äquivalenten Darstellungen werden beide als *Fresnel'sches Beugungsintegral* und im Folgenden kurz als *Beugungsintegral* bezeichnet. Der Gültigkeitsbereich der den Gleichungen zugrunde liegenden Approximation wird *Fresnel-Bereich* oder einfach *Nahfeld* genannt. In Kapitel 2.2 werden beide Darstellungen des Beugungsintegrals in ihre diskreten Formen überführt. Es sei bereits an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass sich trotz der Äquivalenz in kontinuierlichen Koordinaten signifikante Unterschiede bei der numerischen Auswertung ergeben.

2.1.2.3 Gültigkeit der Fresnel-Approximation

Bei der Fresnel-Approximation werden die sphärischen Elementarwellen des Huygens-Fresnel-Prinzips durch ihre parabolische Näherung ersetzt (Gleichung 2.10). Die Genauigkeit der Näherung ergibt sich durch Berechnung des Fehlers, der sich aus der Vernachlässigung aller Terme der Taylor-Entwicklung bis auf die ersten beiden ergibt. Zur Ableitung eines Kriteriums für die Gültigkeit der Fresnel-Approximation wird in der Literatur oftmals nur der dritte Term der Reihenentwicklung ($\frac{1}{8}b^2$) betrachtet. Demnach ist eine hinreichende Bedingung für die Genauigkeit, dass der größte durch Vernachlässigung des $\frac{1}{8}b^2$ -Terms verursachte Fehler deutlich kleiner als 1 rad ist. Diese Bedingung wird für Abstände z erfüllt, für die gilt:

$$z^3 \gg \max \left\{ \frac{\pi}{4\lambda} \left((x - \xi)^2 + (y - \eta)^2 \right)^2 \right\}. \quad (2.16)$$

Damit ergibt sich für eine quadratische Apertur der Breite 5 mm (typischer Wert für einen CCD-Sensor) und einer Wellenlänge des Lichts im mittleren sichtbaren Spektralbereich von 500 nm ein Mindestabstand von $z \gg 0,25$ m. Das würde bedeuten, dass die Objektwelle durch numerische Auswertung des Beugungsintegrals nicht in unmittelbarer Nähe (wenige Millimeter Abstand) zur Hologrammebene rekonstruiert werden kann.

Die folgenden Überlegungen zeigen, dass die Bedingung 2.16 aufgeweicht werden kann. Denn es ist nicht notwendigerweise erforderlich, dass die Terme höherer Ordnung der Taylor-Entwicklung jeder für sich klein sind, nur ihr Beitrag zum Integral muss gegenüber dem Rest klein sein. In Analogie zur Darstellung des Beugungsintegrals als Faltung (Gleichung 2.11) sind in Abbildung 2.2 der Betrag und die Phase des Integrals über das Intervall $[-X, X]$ einer komplexen quadratischen Exponentialfunktion aufgetragen (Gleichung 2.17). Die x -Achse ist durch den halben Integrationsbereich X gegeben.

$$I(X) = \int_{-X}^X \exp(i\pi\xi^2) d\xi \quad (2.17)$$

Die in Abbildung 2.2 (a) aufgetragene Kurve erreicht bei $X = 0,5$ den Wert Eins und oszilliert anschließend mit kleiner werdender Amplitude um diesen Wert. Für Werte $|X| \gg 2$ ändert sich der Betrag des Integrals nicht mehr signifikant. Ähnliches gilt für die in Abbildung 2.2 (b) dargestellte Phase des Integrals. Für Werte $|X| \gg 2$ stabilisiert sich die Kurve um den Wert $\pi/4$.

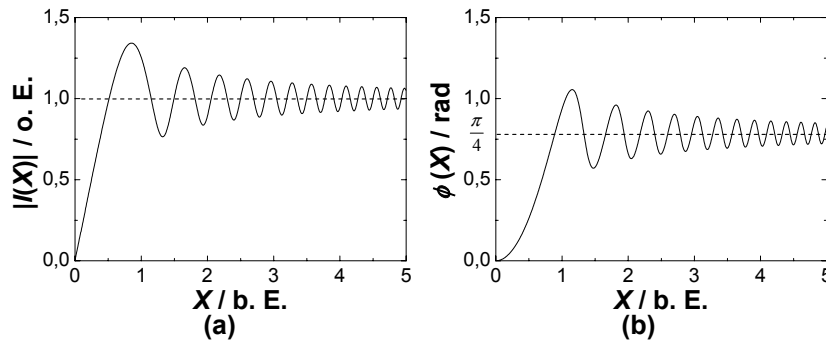


Abbildung 2.2: Integral über komplexe quadratische Exponentialfunktion (Gleichung 2.17) aufgetragen über dem halben Integrationsbereich: (a) Absolutbetrag, (b) Phase.

In Analogie hierzu ergibt sich für Gleichung 2.11, dass der größte Anteil am Beugungsintegral aus einem Quadrat in der x, y -Ebene mit einer Seitenlänge von $4\sqrt{\lambda z}$ kommt.

Wichtig: Diese Schlussfolgerung gilt nur für relativ glatte, d. h. nur langsam variierende, komplexe Amplituden. Enthält $\Psi_0(x, y)$ sich schnell ändernde Komponenten, z. B. einen sinusförmigen Anteil mit hoher Raumfrequenz, dann interagiert dieser Anteil mit hochfrequenten Anteilen des quadratischen Exponentialfaktors und liefert einen nicht zu vernachlässigenden Beitrag zum Integral.

2.1.2.4 Fresnel-Approximation im Spektralbereich

Um ein quantitatives Kriterium für die Gültigkeit der Fresnel-Approximation zu bestimmen ist eine Analyse im Spektralbereich sinnvoll. Gleichung 2.18 beschreibt die Übertragungsfunktion der Wellenausbreitung im freien Raum [50, 51].

$$H(v_\xi, v_\eta) = \begin{cases} \exp\left(i2\pi\frac{z}{\lambda}\sqrt{1 - (\lambda v_\xi)^2 - (\lambda v_\eta)^2}\right) & \sqrt{v_\xi^2 + v_\eta^2} < \frac{1}{\lambda} \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (2.18)$$

Anwendung der Fouriertransformation auf die Impulsantwort des Beugungsintegrals (Gleichung 2.13) liefert folgende Übertragungsfunktion für die Fresnel-Propagation:

$$\begin{aligned} H(v_\xi, v_\eta) &= \mathcal{F} \left\{ \frac{\exp\left(i\frac{2\pi z}{\lambda}\right)}{i\lambda z} \exp\left(i\frac{\pi}{\lambda z}(\xi^2 + \eta^2)\right) \right\} \\ &= \exp\left(i\frac{2\pi z}{\lambda}\right) \exp\left(-i\pi\lambda z(v_\xi^2 + v_\eta^2)\right). \end{aligned} \quad (2.19)$$

Zum Vergleich der Approximation (Gleichung 2.19) mit der allgemein gültigen Übertragungsfunktion des freien Raumes wird der Wurzelterm in Gleichung 2.18 nach Taylor entwickelt:

$$\sqrt{1 - (\lambda v_\xi)^2 - (\lambda v_\eta)^2} \approx 1 - \frac{(\lambda v_\xi)^2}{2} - \frac{(\lambda v_\eta)^2}{2}. \quad (2.20)$$

Damit ergibt sich exakt die durch Gleichung 2.19 gegebene Übertragungsfunktion. Zulässig ist die Näherung 2.20 für $|\lambda v_\xi| \ll 1$ und $|\lambda v_\eta| \ll 1$, wodurch die Gültigkeit der Fresnel-Approximation auf kleine Winkel beschränkt wird.

Der Raumfrequenzbereich, den ein CCD-Sensor aufzeichnen kann, ist durch den Pixelabstand Δx begrenzt. Das Abtasttheorem besagt: $\max\{v_{\text{CCD}}\} = \frac{1}{2\Delta x}$.

Mit einer Wellenlänge der Strahlung im mittleren sichtbaren Spektralbereich ($\lambda \approx 500 \text{ nm}$) und einem Pixelabstand von $\Delta x \approx 5 \text{ }\mu\text{m}$ ergibt sich:

$$|\lambda v_\xi| = \left| \frac{500 \text{ nm}}{2 \cdot 5 \text{ }\mu\text{m}} \right| = 0,05 \ll 1. \quad (2.21)$$

Damit ist gezeigt, dass der Abstand bei der Propagation einer komplexe Objekt-welle, die ausschließlich Raumfrequenzanteile enthalten kann, die kleiner als die Nyquist-Frequenz² des verwendeten CCD-Sensors sind, nicht durch die Fresnel-Approximation nach unten begrenzt wird.

Fazit: Der Rekonstruktionsabstand z wird bei der digitalen Holographie nicht durch die Fresnel-Approximation nach unten beschränkt.

2.1.3 Speckle

Wird eine Oberfläche mit kohärentem Licht beleuchtet, bildet das reflektierte Licht in jeder Ebene vor der Oberfläche eine räumlich modulierte Intensitätsverteilung, die als Specklefeld bezeichnet wird. Die Entstehung des Specklefeldes lässt sich nach dem Huygens-Fresnel-Prinzip durch die kohärente Überlagerung der von jedem mikroskopischen Punkt der Objektoberfläche ausgehenden Elementarwellen erklären. Speckle werden als „objektiv“ bezeichnet, wenn sich das Specklefeld frei im Raum ausbreitet. Dagegen wird von „subjektiven“ Speckles gesprochen, wenn ein abbildendes System, z. B. Auge, Linse, Mikroskopobjektiv, die Specklegröße verändert. Dabei ist die Specklegröße d_s nicht von der Rauigkeit der Oberfläche abhängig.

$$d_s \approx 1,2 \frac{\lambda D}{b} \quad (2.22)$$

Für objektive Speckle ergibt sich d_s gemäß Gleichung 2.22 aus der Größe der beleuchteten Objektoberfläche D , dem Abstand zum Objekt b und der Wellenlänge des eingestrahlt Lichts λ . Im Fall subjektiver Speckles beschreibt D den Durchmesser der begrenzenden Apertur und b den Abstand zu dieser Apertur [47].

²Die Nyquist-Frequenz ist die minimale Frequenz, mit der ein kontinuierliches Signal abgetastet werden muss, ohne dass dabei Fehler entstehen. Diese Fehler werden als „Aliasing“ oder „Moire-Effekt“ bezeichnet. Die Nyquist-Frequenz ist doppelt so groß, wie die größte im Signal vorhandene Frequenz ($f_{\text{Nyq}} = 2f_{\text{max}}$) [52, 53].

Voraussetzung für die Entstehung eines Specklefeldes ist, dass die Oberflächenrauigkeit in der Größenordnung der Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes liegt [54]. Bei der Durchleuchtung transparenter Objekte hängt die Entstehung des Specklefeldes von der Dichte der im beleuchteten Volumenelement vorhandenen Streuzentren ab.

Im Rahmen dieser Arbeit werden ausschließlich technische Objekte, deren Oberflächenrauigkeit weit unterhalb der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts liegt, und dünne biologische Proben (meist nur eine Zellschicht) untersucht. Die Kantenlänge der dabei beleuchteten Volumenelemente beträgt nur einige zehn Mikrometer, so dass die Anzahl der beleuchteten Streuzentren sehr gering ist. Als gute Näherung für mikroskopische Untersuchungen wird deshalb die Born Approximation erster Ordnung [51] angenommen, so dass Vielfachstreuung und das dadurch generierte Specklerauschen vernachlässigt werden können [55]. Für Informationen zur Auswertung von Speckleinterferogrammen wird auf die umfangreich zu diesem Thema vorhandene Literatur verwiesen, z. B. [52, 54, 56, 57].

2.2 Diffraktive Rekonstruktionsverfahren

Als *diffraktive Rekonstruktionsverfahren* werden Algorithmen bezeichnet, die das Beugungsintegral numerisch auswerten. In Kapitel 2.1.2 wurden zwei in kontinuierlichen Koordinaten zueinander äquivalente Darstellungen des Beugungsintegrals vorgestellt (Gleichung 2.11 und 2.15). In den folgenden Abschnitten werden beide Gleichungen in ihre diskrete Form überführt und dabei auftretende Unterschiede beschrieben.

Zur numerischen Rekonstruktion der komplexen Objektwelle mit diffraktiven Verfahren wird analog zur konventionellen Holographie die Amplitude des mathematischen Modells der Referenzwelle mit der gemessenen räumlichen Intensitätsverteilung im Interferogramm moduliert. Das Ergebnis ist eine komplexe diskrete zweidimensionale Amplitudenverteilung:

$$\Psi_0(k, l) = I_H(k, l) R(k, l). \quad (2.23)$$

Im Rahmen dieser Arbeit wird ausschließlich mit einer ebenen Referenzwelle rekonstruiert. Mathematisch wird eine sich in z -Richtung ausbreitende ebene Welle beschrieben durch [51]:

$$R(k, l) = A_R(k, l) \exp\left(-i \frac{2\pi z}{\lambda}\right). \quad (2.24)$$

Die rechte Seite von Gleichung 2.24 ist bei konstanter Amplitude unabhängig von den Koordinaten ($A_R \equiv A_R(k, l)$). Der komplexe Exponentialfaktor bewirkt einen über die gesamte Ebene konstanten Phasenshift, der vom Abstand z und der Wellenlänge λ abhängig ist. Da die räumliche Phasenverteilung der Objektwelle nur relativ gemessen werden kann und A_R nur Einfluss auf die Skalierung der Amplitude der rekonstruierten Objektwelle hat, kann $\Psi_0(k, l)$ durch $I_H(k, l)$ ersetzt werden.

Der Vollständigkeit halber wird in Kapitel 2.2.1 außerdem kurz auf die Rekonstruktion mit einer sphärischen Referenzwelle eingegangen. Gleichung 2.25 beschreibt eine sphärische Referenzwelle in paraxialer Näherung deren Quellpunktabstand zur Hologrammebene durch z_r gegeben ist [51].

$$R(k, l) = \frac{A_R}{z_r} \exp\left(-i \frac{2\pi}{\lambda} z_r\right) \exp\left(-i \frac{2\pi}{\lambda} (k^2 \Delta x^2 + l^2 \Delta y^2)\right) \quad (2.25)$$

2.2.1 Diskrete Fresneltransformation (DFT)

Gleichung 2.15 beschreibt das Beugungsintegral (Fresnel-Approximation) in einer Form, die auch als Fouriertransformationsdarstellung bezeichnet wird. Zunächst wird diese Darstellung in ihre diskrete Form überführt:

$$\begin{aligned} \Psi_z(m, n) &= \frac{\exp\left(i \frac{2\pi z}{\lambda}\right)}{i \lambda z} \exp\left(i \pi \lambda z \left(\frac{m^2}{N_x^2 \Delta x^2} + \frac{n^2}{N_y^2 \Delta y^2}\right)\right) \times \\ &\sum_{k=0}^{N_x-1} \sum_{l=0}^{N_y-1} \Psi_0(k, l) \exp\left(i \frac{\pi}{\lambda z} (k^2 \Delta x^2 + l^2 \Delta y^2)\right) \exp\left(-i 2\pi \left(\frac{k m}{N_x} + \frac{l n}{N_y}\right)\right). \end{aligned} \quad (2.26)$$

Gleichung 2.26 wird als *diskrete Fresneltransformation* (kurz: DFT) bezeichnet [11, 25, 52]. Dabei ist die Größe des Hologramms (Anzahl der diskreten Werte) durch N_x und N_y gegeben. Die diskreten Indizes in der Hologrammebene ($z = 0$) werden mit $k = 0, \dots, N_x - 1$ und $l = 0, \dots, N_y - 1$ und die diskreten Indizes in der Ebene des rekonstruierten Bildes mit $m = 0, \dots, N_x - 1$ und $n = 0, \dots, N_y - 1$ bezeichnet. Das mit Δx bzw. Δy bezeichnete Sampling-Intervall entspricht dem Pixelabstand des zur Aufzeichnung des digitalen Hologramms verwendeten Sensors. In der Ebene des rekonstruierten Bildes ergibt sich aufgrund der durch Gleichung 2.14 beschriebenen Koordinatentransformation für das Sampling-Intervall [28, 52]:

$$\Delta \xi = \frac{\lambda z}{N_x \Delta x} \quad \text{bzw.} \quad \Delta \eta = \frac{\lambda z}{N_y \Delta y}. \quad (2.27)$$

Aus Gleichung 2.27 folgt direkt, dass die Größe des rekonstruierten Beugungsbildes ($N_x \Delta \xi$ bzw. $N_y \Delta \eta$) linear mit dem Rekonstruktionsabstand wächst:

$$\Delta X = \frac{\lambda z}{\Delta x} \quad \text{bzw.} \quad \Delta Y = \frac{\lambda z}{\Delta y}. \quad (2.28)$$

Der Vollständigkeit halber sei hier noch die Rekonstruktion mit einer sphärischen Referenzwelle erwähnt. Multiplikation der durch Gleichung 2.25 beschriebenen sphärischen Referenzwelle mit der gemessenen räumlichen Intensitätsverteilung $I_H(k, l)$ und Einsetzen in Gleichung 2.26 ergibt:

$$\begin{aligned} \Psi_z(m, n) = & \frac{A_R}{z_r} \frac{\exp(i \frac{2\pi z}{\lambda})}{i \lambda z} \exp\left(i \pi \lambda z \left(\frac{m^2}{N_x^2 \Delta x^2} + \frac{n^2}{N_y^2 \Delta y^2}\right)\right) \times \\ & \sum_{k=0}^{N_x-1} \sum_{l=0}^{N_y-1} I_H(k, l) \exp\left(i \frac{\pi}{\lambda} (k^2 \Delta x^2 + l^2 \Delta y^2) \left(\frac{1}{z} - \frac{1}{z_r}\right)\right) \times \\ & \exp\left(-i 2 \pi \left(\frac{k m}{N_x} + \frac{l n}{N_y}\right)\right). \end{aligned} \quad (2.29)$$

Die im Vergleich zur DFT mit ebener Referenzwelle abweichenden Terme sind in Gleichung 2.29 unterstrichen dargestellt. Der Spezialfall bei dem der Rekonstruktionsabstand dem Quellpunktabstand der sphärischen Referenzwelle zur Hologrammebene entspricht ($z = z_r$) wird als *Fourierholographie* bezeichnet, da sich dann Gleichung 2.29 unter Vernachlässigung der komplexen Vorfaktoren zu einer einfachen zweidimensionalen Fouriertransformation vereinfacht [58].

Bei der Rekonstruktion der komplexen Objektwelle mit DFT muss das Sampling-Theorem³ berücksichtigt werden. Unter der Annahme, dass die Amplitudenverteilung $I_H(x, y)$ keine Frequenzanteile oberhalb der Nyquist-Frequenz f_{Nyq} enthält, ergibt sich aus der Betrachtung des quadratischen Exponentialfaktors in Gleichung 2.26 für den Rekonstruktionsabstand (exemplarisch eindimensional für Δx):

$$\frac{\pi \Delta x^2}{\lambda |z|} k^2 \leq 2 \pi f_G. \quad (2.30)$$

Dabei beschreibt f_G die durch die Anzahl der diskreten Elemente N_x gegebene normierte Grenzfrequenz $f_G = \frac{N_x}{2}$. Wird zusätzlich der maximale Index $k_{\text{max}} = N_x$ in die Ungleichung 2.30 eingesetzt, ergibt sich:

$$|z| \geq \frac{\Delta x^2 N_x}{\lambda}. \quad (2.31)$$

³Das Sampling-Theorem besagt, mit welcher Frequenz ein kontinuierliches Signal abgetastet werden muss, damit das diskrete Signal das Original exakt repräsentiert [52, 53].

In Analogie dazu gilt für den Phasenfaktor vor der Doppelsumme in Gleichung 2.26 die Beziehung:

$$|z| \leq \frac{\Delta x^2 N_x}{\lambda}. \quad (2.32)$$

Aus den Beziehungen 2.31 und 2.32 folgt, dass das Sampling-Theorem nur für den in der Praxis kaum zu realisierenden Spezialfall $z = \frac{\Delta x^2 N_x}{\lambda}$ erfüllt wird. Für kleine Rekonstruktionsabstände geht die Größe des berechneten Beugungsbildes (Gleichung 2.28) gegen Null, so dass im „Nahfeld“ kein Beugungsbild berechnet werden kann. Bei großen Rekonstruktionsabständen variiert die Phase sehr stark, was bei der Rekonstruktion der räumlichen Phasenverteilung starkes Aliasing zur Folge hat, sich aber nicht auf die Amplitude bzw. die Intensität des rekonstruierten holographischen Bildes auswirkt. In [15, 59] werden an die Geometrie des experimentellen Aufbaus angepasste Korrekturterme in Gleichung 2.26 eingefügt, die eine direkte Rekonstruktion der räumlichen Phasenverteilung der Objektwelle ermöglichen. Aufgrund der Einschränkungen der DFT bei kurzen Rekonstruktionsabständen durch Aliasing, das durch die Korrekturterme nicht beeinflusst wird, werden im Rahmen dieser Arbeit andere Methoden zur Rekonstruktion der Phase eingesetzt, die in den folgenden Kapiteln beschrieben werden. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die DFT (ohne zusätzliche Korrekturterme) nur zur Rekonstruktion der Amplitude bzw. der Intensität der Objektwelle im Fernfeld direkt einsetzbar ist. In der Praxis wird die Doppelsumme in Gleichung 2.26 meist durch eine schnelle Fouriertransformation berechnet:

$$\begin{aligned} \Psi_z(m, n) = & \frac{\exp\left(i\frac{2\pi z}{\lambda}\right)}{i\lambda z} \exp\left(i\pi\lambda z \left(\frac{m^2}{N_x^2 \Delta x^2} + \frac{n^2}{N_y^2 \Delta y^2}\right)\right) \times \\ & \text{FFT}\left(\Psi_0(k, l) \exp\left(i\frac{\pi}{\lambda z} (k^2 \Delta x^2 + l^2 \Delta y^2)\right)\right). \end{aligned} \quad (2.33)$$

Abbildung 2.3 (a) zeigt das in „off-axis“ Geometrie aufgezeichnete Hologramm eines transparenten USAF 1951 Test-Charts. Der Abstand zwischen Objekt und Hologrammebene beträgt hier: $z = 34$ cm. Die Rekonstruktion der komplexen Objektwelle mit Gleichung 2.33 ergibt die in Abbildung 2.3 (b) und (c) dargestellte räumliche Amplituden- und Phasenverteilung. Analog zur klassischen Holographie werden die nullte Beugungsordnung und das virtuelle Bild, das in der digitalen Holographie als „Twin-Image“ bezeichnet wird, rekonstruiert. Das rekonstruierte reelle Bild wird entsprechend als „Image“ bezeichnet.

Durch die „off-axis“ Anordnung werden die nullte Beugungsordnung, das „Twin-Image“ und das „Image“ zwar räumlich getrennt rekonstruiert, reduzieren

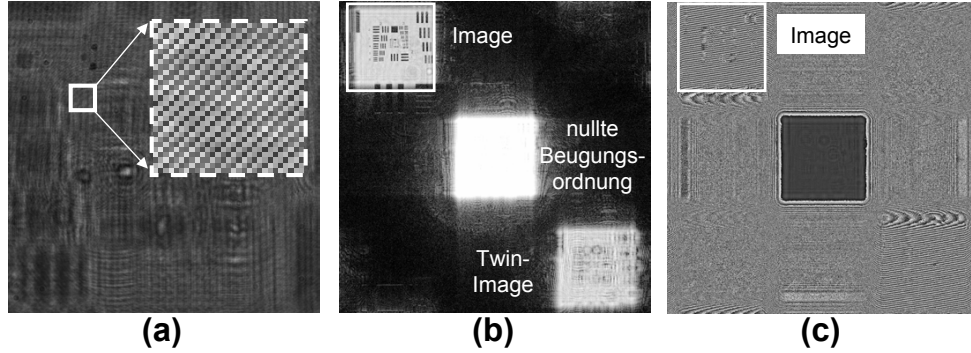


Abbildung 2.3: (a) In „off-axis“ Geometrie aufgezeichnetes Hologramm (1024×1024 Pixel) mit Ausschnittsvergrößerung, (b) mit der DFT rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung (logarithmische Darstellung), (c) zugehörige räumliche Phasenverteilung mod 2π .

dadurch aber den Bildbereich, der für das „Image“ zur Verfügung steht. Darüber hinaus ist die mittlere Intensität der nullten Beugungsordnung um ein Vielfaches größer, als die von „Image“ und „Twin-Image“, so dass das „Image“ erst durch weitere Bildverarbeitung mit ausreichendem Kontrast sichtbar wird, z. B. durch eine logarithmische Darstellung.

2.2.2 Faltungsmethode (CVM)

In Kapitel 2.1.2.2 wurde gezeigt, dass das Beugungsintegral durch eine Faltung (Gleichung 2.11) beschrieben werden kann und dies zur Darstellung als Fouriertransformation äquivalent ist. Für eine übersichtlichere Notation wird in diesem Abschnitt der konstante Phasenfaktor $\frac{1}{i\lambda z} \exp\left(i\frac{2\pi z}{\lambda}\right)$ aus Gleichung 2.11 vernachlässigt:

$$\Psi_z(x, y) = \Psi_0(x, y) \otimes \exp\left(i\frac{\pi}{\lambda z}(x^2 + y^2)\right). \quad (2.34)$$

Anwendung der Fouriertransformation und des Faltungssatzes⁴ auf Gleichung 2.34 ergibt:

$$\begin{aligned} \mathcal{F}\{\Psi_z(x, y)\} &= \mathcal{F}\{\Psi_0(x, y)\} \mathcal{F}\left\{\exp\left(i\frac{\pi}{\lambda z}(x^2 + y^2)\right)\right\} \\ &= \mathcal{F}\{\Psi_0(x, y)\} \exp(-i\pi\lambda z(\xi^2 + \eta^2)). \end{aligned} \quad (2.35)$$

⁴Die Fouriertransformierte einer Faltung im Ortsraum entspricht einer Multiplikation der Fouriertransformierten im Frequenzraum: $\mathcal{F}\{g \otimes h\} = \mathcal{F}\{g\} \cdot \mathcal{F}\{h\}$ [53].

Dabei werden die Ortskoordinaten im Frequenzraum mit ξ und η bezeichnet. Alternativ zur DFT wird hier nicht die räumliche Amplitudenverteilung $\Psi_0(x, y)$ selbst propagiert, sondern deren Raumfrequenzspektrum $\mathcal{F}\{\Psi_0(x, y)\}$. Anschließend wird eine inverse Fouriertransformation durchgeführt [28]:

$$\Psi_z(x, y) = \mathcal{F}^{-1} \left\{ \mathcal{F} \{ \Psi_0(x, y) \} \exp \left(-i\pi\lambda z (\xi^2 + \eta^2) \right) \right\}. \quad (2.36)$$

Die durch Gleichung 2.36 beschriebene Transformation wird in der Literatur als „Faltungs-Methode“ (engl. „Convolution Method“, kurz: CVM) bezeichnet [24, 25, 27, 60, 61]. In eine diskrete Schreibweise überführt ergibt sich aus Gleichung 2.36:

$$\Psi_z(k, l) = \text{FFT}^{-1} \left\{ \text{FFT} \{ \Psi_0(k, l) \} \exp \left(-i\pi\lambda z \left(\frac{m^2}{\Delta x^2 N_x^2} + \frac{n^2}{\Delta y^2 N_y^2} \right) \right) \right\} \quad (2.37)$$

Der quadratische Phasenfaktor in Gleichung 2.37 erfüllt das Abtasttheorem unter der Bedingung (eindimensional für Δx):

$$|z| \leq \frac{\Delta x^2 N_x}{\lambda}, \quad (2.38)$$

so dass für kleine Rekonstruktionsabstände im Gegensatz zur DFT kein Aliasing auftritt.

Obwohl die DFT (Gleichung 2.26) und die CVM (Gleichung 2.37) numerisch das gleiche Integral auswerten, führen sie zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die Ursache hierfür besteht in der Verwendung der diskreten Fouriertransformation bei der Propagation. Während sich bei der DFT der abgetastete Bereich entsprechend Gleichung 2.28 linear mit dem Rekonstruktionsabstand vergrößert, bleibt bei der CVM durch die Hin- und Rücktransformation das Sampling-Intervall konstant [28]:

$$\Delta\xi = \Delta x \quad \text{bzw.} \quad \Delta\eta = \Delta y. \quad (2.39)$$

Daher muss für die direkte Rekonstruktion von in „off-axis“ Geometrie aufzeichneten digitalen Hologrammen mit der CVM die Anzahl der diskreten Werte $N_x \times N_y$ von $I_H(k, l)$ vergrößert werden, was in der Praxis durch das Anfügen von Feldern mit dem Wert Null realisiert wird:

$$I'_H(k, l) = \begin{cases} I_H(k, l) & \text{für } \frac{N'_x}{2} - \frac{N_x}{2} \leq k < \frac{N'_x}{2} + \frac{N_x}{2} \\ & \text{und } \frac{N'_y}{2} - \frac{N_y}{2} \leq l < \frac{N'_y}{2} + \frac{N_y}{2} \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (2.40)$$

mit $N'_x \gg N_x$ und $N'_y \gg N_y$.

Fazit: Das Beugungsintegral kann mit der DFT nur für große Rekonstruktionsabstände numerisch ausgewertet werden, da bei kleinen Rekonstruktionsabständen durch Verletzung des Sampling-Theorems Aliasing-Effekte auftreten (Ungleichung 2.31). Eine weitere Eigenschaft der DFT ist die durch Gleichung 2.27 beschriebene Koordinatentransformation, die zur Folge hat, dass die Größe des rekonstruierten Beugungsbildes linear mit dem Rekonstruktionsabstand z ansteigt (Gleichung 2.28). Dagegen bleibt bei der CVM das Sampling-Intervall konstant (Gleichung 2.39), so dass die Größe des rekonstruierten Bildausschnittes nicht vom Rekonstruktionsabstand z abhängt. Objektebenen mit kleinem Rekonstruktionsabstand werden ohne das Auftreten von Aliasing-Effekten rekonstruiert (Ungleichung 2.38). Wie in Kapitel 2.1.2 gezeigt wurde, liefert die Fresnel-Approximation, die sowohl der DFT als auch der CVM zugrunde liegt, schon für kleine z gute Ergebnisse, solange $z \gg \lambda$ erfüllt ist. Für die direkte Rekonstruktion von in „off-axis“ Geometrie aufgezeichneten Hologrammen mit CVM muss das digitale Hologramm durch Anfügen von Feldern mit dem Wert Null vergrößert werden ($N_x \rightarrow N'_x, N_y \rightarrow N'_y$), wodurch sich die für die Transformation benötigte Rechenzeit verlängert. Durch das Anfügen von Nullen wird gleichzeitig der z -Bereich vergrößert, in dem Objektebenen ohne das Auftreten von Aliasing-Effekten rekonstruiert werden können (Gleichung 2.38 mit $N_x \rightarrow N'_x$).

2.3 Auflösung optischer Systeme zur digitalholographischen Mikroskopie

Die laterale Auflösung wird bei der digitalen Holographie ohne abbildende Optik durch den zur Aufzeichnung verwendeten Sensor begrenzt. Gleichung 2.27 beschreibt die bei der diskreten Fresneltransformation durchgeführte Koordinatentransformation von der Bildebene in die Hologrammebene. Unter Berücksichtigung der Nyquist-Frequenz ergibt sich für die kleinste auflösbare Struktur:

$$\Delta d_x = \frac{2\lambda z}{N_x \Delta x} \quad \text{bzw.} \quad \Delta d_y = \frac{2\lambda z}{N_y \Delta y}. \quad (2.41)$$

Bei der Faltungsmethode findet zwischen Bildebene und Hologrammebene keine Koordinatentransformation statt (Gleichung 2.39). Demnach scheint es, dass die Auflösung lediglich durch den Einsatz von CCD-Sensoren mit kleinerem Pixelabstand unabhängig vom Abstand des Sensors zum Objekt verbessert werden kann. Diese Annahme ist falsch, da es sich bei Gleichung 2.39 lediglich um einen numerischen Wert handelt. Die physikalische Auflösung wird durch Beugung begrenzt, so dass Gleichung 2.41 auch für die Rekonstruktion mit der Faltungsmethode die Auflösung vorgibt [62].

Nach Gleichung 2.41 kann durch möglichst nahe Platzierung des Objekts am Sensor die Auflösung des Systems verbessert werden. Hierbei sind die Grenzen durch die technische Realisierung gegeben. Ein Mindestabstand von $z \approx 2 \text{ cm}$ ist für die Überlagerung einer Referenzwelle in „off-axis“ Anordnung bei Verwendung eines Strahlteilerwürfels notwendig. Dabei ist zu berücksichtigen, dass das durch die Überlagerung der Objekt- mit einer Referenzwelle generierte Interferenzmuster keine Raumfrequenzanteile oberhalb der Nyquist-Frequenz enthält.

Bei der Verwendung von Licht der Wellenlänge $\lambda = 500 \text{ nm}$ und typischen Werten für die Anzahl der Pixel ($N_x \times N_y = 1024 \times 1024$) und den Pixelabstand eines CCD-Sensors ($\Delta x = \Delta y = 5 \text{ }\mu\text{m}$) können Strukturen bis zu einer Größe von $4 \text{ }\mu\text{m}$ aufgelöst werden. Aufgrund dieser Limitierung und der hohen technischen Anforderungen an die Platzierung des Sensors bei einem linsenlosen System, werden im Rahmen dieser Arbeit Mikroskopoptiken zur Vergrößerung der Objektwelle eingesetzt. Beispiele technischer Realisierungsmöglichkeiten und speziell an die linsenlose Konfiguration angepasste Algorithmen werden in der Literatur u. a. in [20, 63, 64, 65, 66] beschrieben.

Die Auflösung eines optischen Systems ist durch Beugung begrenzt und hängt von der Wellenlänge des Lichts und dessen numerischer Apertur $\text{NA} = n \sin \alpha$ ab. Dabei wird der halbe Öffnungswinkel zwischen den Randstrahlen mit α und der Brechungsindex des umgebenden Mediums mit n bezeichnet. Das *Abbe-Kriterium* besagt, dass der minimale Abstand d zweier Punkte, die noch als getrennt wahrgenommen werden können durch Gleichung 2.42 gegeben ist [67].

$$d \approx \frac{0,61\lambda}{\text{NA}} \quad (2.42)$$

Wie bei der Hellfeldmikroskopie können bei der digitalen Holographie Mikroskopoptiken zur Vergrößerung der Objektwelle verwendet werden [12, 13, 14, 68]. Dabei wird die laterale Auflösung *nur* durch die numerische Apertur des Mikroskopobjektivs NA und die Lichtwellenlänge λ begrenzt (Gleichung 2.42). Um Unterabtasten bei der Diskretisierung zu vermeiden muss gewährleistet sein, dass die durch Beugung begrenzte kleinste noch auflösbare Strukturbereite der vergrößerten Objektwelle größer als der doppelte Pixelabstand des Sensors ist.

Die wichtigsten auf einem Mikroskopobjektiv angegebenen Kenngrößen sind die Vergrößerung V und die numerische Apertur NA . Für weitere Überlegungen in Kapitel 2.5 ist außerdem die Kenntnis der effektiven Brennweite des Mikroskopobjektivs f erforderlich. Für Standard-Mikroskopobjektive, die für eine normierte Tubuslänge von 160 mm hergestellt sind, gilt (Angabe der Firma Carl Zeiss Jena GmbH):

$$f \approx \frac{165 \text{ mm}}{V}. \quad (2.43)$$

Der axiale Bereich der Abbildungsebenen, in dem ein Objektiv fokussiert wird, ohne dass sich die Schärfe der abgebildeten Objektstrukturen signifikant verändert, wird als Schärfentiefe (engl. „Depth of Field“) bezeichnet und ist durch folgende Gleichung gegeben [69]:

$$\Delta z_{\text{DOF}} = \frac{n\lambda}{\text{NA}^2} + \frac{n\Delta x}{\text{NA} V}. \quad (2.44)$$

Hierbei gibt der erste Term in Gleichung 2.44 den durch die Beugung begrenzten Schärfentiefebereich an und dominiert die Auflösung für große numerische Aperturen. Der zweite Summand hängt von der Gesamtvergrößerung des optischen Systems V und dem Pixelabstand Δx bzw. Δy des zur Aufnahme verwendeten Sensors ab und beschreibt den geometrischen Schärfentiefebereich. Auf die digitale Holographie übertragen gibt die Schärfentiefe die Auflösung an, mit der in verschiedenen Abständen numerisch rekonstruierte Objektebenen voneinander getrennt werden können.

2.4 Nicht diffraktive Rekonstruktionsverfahren

Unter dem Begriff *nicht diffraktive Rekonstruktionsverfahren* werden im Rahmen dieser Arbeit alle numerischen Methoden zur Rekonstruktion der Objektwelle zusammengefasst, die nicht auf der Auswertung des Beugungsintegrals basieren. Nach einer allgemeinen Einleitung über Phasenschiebungsverfahren werden in diesem Abschnitt eine Methode zur Rekonstruktion der komplexen Objektwelle im Ortsraum und eine Methode zur Rekonstruktion im Frequenzraum ausführlich vorgestellt.

2.4.1 Phasenschiebungsverfahren

Die Grundidee der Phasenschiebungsverfahren besteht darin, die nichtlineare Intensitätsmodulation der Interferogrammgleichung (Gleichung 2.4) auf geeignete Weise in relative Phasenwerte umzurechnen [70]. Die gemessene diskrete räumliche Intensitätsverteilung, die durch Interferenz zweier kohärenter Wellen entsteht, wird mit Hilfe der Interferogrammgleichung unter Berücksichtigung der Pixelintegration (Gleichung 2.6) beschrieben:

$$I(k, l) = I_0(k, l) + \gamma(k, l) \cos(\varphi(k, l)). \quad (2.45)$$

Dabei ist die Untergrundintensität durch $I_0(k, l) = I_O(k, l) + I_R(k, l)$, der Modulationsgrad durch $\gamma(k, l) = 2\sqrt{I_O(k, l)I_R(k, l)}$ und die Phasendifferenz zwischen Objekt- und Referenzwelle durch $\varphi(k, l)$ gegeben.

Da Gleichung 2.45 drei Unbekannte enthält, werden zu ihrer Bestimmung Phasenschiebungsverfahren eingesetzt. Dabei wird die Phase im Interferogramm global um einen bestimmten Phasenwinkel geschoben, während die Unbekannten I_0 , γ , und φ konstant gehalten werden. Aus Gleichung 2.45 wird dann:

$$I_i(k, l) = I_0(k, l) + \gamma(k, l) \cos(\varphi(k, l) + \alpha_i). \quad (2.46)$$

Werden mindestens drei Interferogramme des gleichen Objektzustandes mit unterschiedlichem α_i aufgenommen lässt sich das Gleichungssystem lösen. Bei der Erzeugung des Phasenshifts wird zwischen zeitlichem Phasenschieben (engl. „Temporal Phase Shifting“, kurz: TPS) und räumlichem Phasenschieben (engl. „Spatial Phase Shifting“, kurz: SPS) unterschieden. Beim TPS werden nacheinander mindestens drei Interferogramme aufgenommen, wobei nach jeder Aufnahme die Phase um einen bestimmten Winkel α_i geschoben wird. Dagegen wird beim SPS nur ein Interferogramm aufgenommen. Durch einen Winkel zwischen Objekt- und Referenzwelle wird ein über den Sensor linear ansteigender Phasenshift erzeugt. Das entspricht im Wesentlichen der holographischen „off-axis“ Anordnung. Der Nachteil des TPS besteht darin, dass es während der Aufnahme der (min. drei) Interferogramme zu Phasenfluktuationen kommen kann, wodurch die Messergebnisse verfälscht werden. Dies ist beim SPS nicht der Fall. Für eine ausführliche Beschreibung einer Vielzahl von Phasenschiebungsverfahren wird auf die Literatur verwiesen, z. B. [35, 56, 71, 72, 73, 74, 75, 76].

2.4.2 Räumliche Phasenverteilung in der Hologrammebene

Im einfachsten Fall wird eine holographische „off-axis“ Anordnung dadurch realisiert, dass das Objekt kollimiert beleuchtet und die vom Objekt ausgehende Objektwelle unter einem Winkel β mit einer ebenen Referenzwelle überlagert wird (Abbildung 2.4 (a)). Zur Veranschaulichung ist der Winkel β , der in der Praxis maximal 1° - 2° beträgt, deutlich größer dargestellt. Der Winkel zwischen Objekt- und Referenzwelle $\beta = (\beta_x, \beta_y)$ bewirkt ein lineares Ansteigen in der Phasenbeziehung zwischen Objekt- und Referenzwelle in der Hologrammebene (exemplarisch für die x -Richtung):

$$\varphi(x) = \varphi_x^{(1)} x \quad \text{mit} \quad x = k\Delta x. \quad (2.47)$$

Anhand der in Abbildung 2.4 (a) dargestellten geometrischen Beziehungen ergibt sich:

$$\varphi_x^{(1)} = \frac{2\pi \sin(\beta_x)}{\lambda} \approx \frac{2\pi \beta_x}{\lambda} \quad \text{bzw.} \quad \varphi_y^{(1)} = \frac{2\pi \sin(\beta_y)}{\lambda} \approx \frac{2\pi \beta_y}{\lambda}. \quad (2.48)$$

Da der Winkel β sehr klein ist, kann in Gleichung 2.48 die Näherung $\sin(\beta) \approx \beta$ angewendet werden.

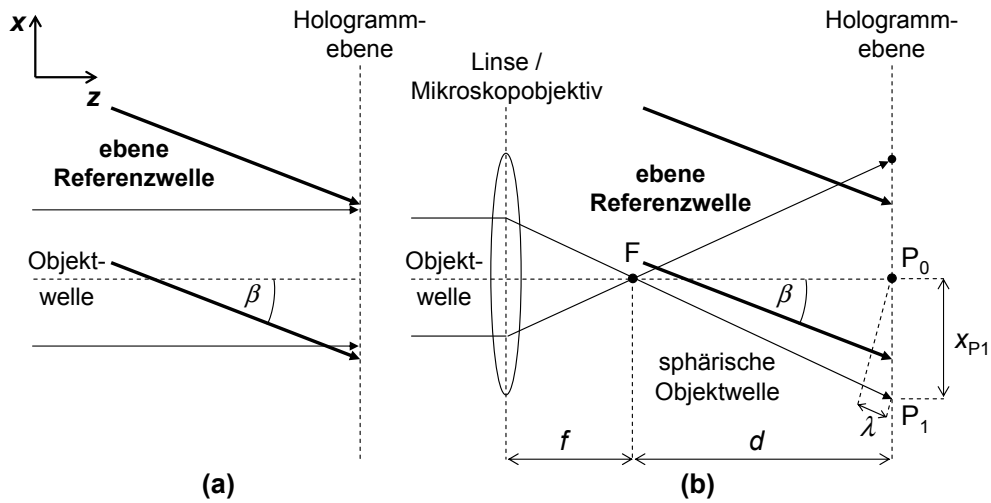


Abbildung 2.4: Geometrische Beziehungen bei der Überlagerung der von einem kollimiert beleuchteten Objekt ausgehenden Objektwelle (a) ohne und (b) mit abbildendem System mit einer ebenen Referenzwelle in holographischer „off-axis“ Anordnung.

Im Fall einer holographischen „off-axis“ Anordnung mit ebener Referenzwelle, bei der die Objektwelle optisch durch ein abbildendes System, z. B. eine Linse oder ein Mikroskopobjektiv, vergrößert wird, so dass eine sphärische Objektwelle vorliegt, wird die Phasenbeziehung zwischen Objekt- und Referenzwelle in der Hologrammebene durch zwei Faktoren bestimmt. Abbildung 2.4 (b) zeigt die geometrischen Beziehungen für den Fall einer durch ein Mikroskopobjektiv generierten sphärischen Objektwelle, die mit einer unter dem Winkel β zur optischen Achse schräg einfallenden ebenen Referenzwelle überlagert wird.

Hierbei bewirkt die sphärische Objektwelle einen zusätzlichen quadratischen Anstieg in der Phasenbeziehung zwischen Objekt- und Referenzwelle. Die Größe des quadratischen Phasenanstiegs ist von der Krümmung der sphärischen Welle abhängig und kann durch den Quellpunktabstand der Objektwelle zur Hologrammebene d ausgedrückt werden. Zur Herleitung dieses Zusammenhangs bedarf es einiger Überlegungen, die im Folgenden eindimensional für die x -Richtung dargestellt sind.

Durch die sphärische Objektwelle wird in der Hologrammebene ein quadratischer Anstieg der Phase erzeugt:

$$\varphi(x) = \varphi_x^{(2)} x^2 \quad \text{mit} \quad x = k\Delta x. \quad (2.49)$$

Der Phasenunterschied zwischen zwei benachbarten Pixeln eines in der Hologrammebene platzierten CCD-Sensors ist durch $\varphi_x^{(2)} \Delta x^2 (2k+1)$ gegeben. In Abbildung 2.4 (b) wird der Abstand x_{P_1} des Punktes P_1 zum Punkt P_0 auf der optischen Achse so gewählt, dass der Gangunterschied einer vom Quellpunkt F ausgehenden Elementarwelle genau eine Wellenlänge beträgt. Es gilt dann:

$$d^2 + x_{P_1}^2 = (d + \lambda)^2. \quad (2.50)$$

Auflösen nach dem Abstand x_{P_1} liefert:

$$x_{P_1} = \sqrt{\lambda^2 + 2\lambda d}. \quad (2.51)$$

Der Gangunterschied der vom Punkt F ausgehenden Elementarwelle zwischen dem Punkt P_0 und dem Punkt P_1 in der Hologrammebene entspricht einer Phasendifferenz von:

$$\varphi_{P_1} = 2\pi. \quad (2.52)$$

Einsetzen der Gleichungen 2.51 und 2.52 in Gleichung 2.49 ergibt für $\varphi_x^{(2)}$ bzw. durch die Substitution $x \rightarrow y$ für $\varphi_y^{(2)}$:

$$\varphi_x^{(2)} = \frac{2\pi}{\lambda^2 + 2\lambda d} \quad \text{bzw.} \quad \varphi_y^{(2)} = \frac{2\pi}{\lambda^2 + 2\lambda d}. \quad (2.53)$$

Zusammengefasst ergibt sich demnach durch die in Abbildung 2.5 (a) schematisch dargestellte kohärente Überlagerung einer sphärischen Objektwelle mit einer ebenen Referenzwelle in der Hologrammebene die räumliche Phasenverteilung:

$$\varphi(x, y) = \varphi_x^{(2)} x^2 + \varphi_y^{(2)} y^2 + \varphi_x^{(1)} x + \varphi_y^{(1)} y \quad (2.54)$$

$$= 2\pi \left(\frac{1}{\lambda^2 + 2\lambda d} x^2 + \frac{1}{\lambda^2 + 2\lambda d} y^2 + \frac{\beta_x}{\lambda} x + \frac{\beta_y}{\lambda} y \right). \quad (2.55)$$

Abbildung 2.5 (b) zeigt exemplarisch eine solche räumliche Phasenverteilung in Grauwertdarstellung (ausschnittsweise mod 2π), wie sie sich mit den zufällig ausgewählten Koeffizienten $\varphi_x^{(1)} = 1,6 \cdot 10^4 \text{ m}^{-1}$, $\varphi_y^{(1)} = 9,4 \cdot 10^3 \text{ m}^{-1}$ und $\varphi_{x,y}^{(2)} = 3,9 \cdot 10^6 \text{ m}^{-1}$ ergibt. Der dargestellte quadratische Ausschnitt hat eine Kantenlänge von 0,5 cm. Das in Abbildung 2.5 (c) in Grauwertdarstellung dargestellte Trägerstreifenmuster ergibt sich durch Einsetzen von Gleichung 2.54 in die Interferogrammgleichung 2.4 mit $\gamma_0 = \frac{1}{3} I_0$.

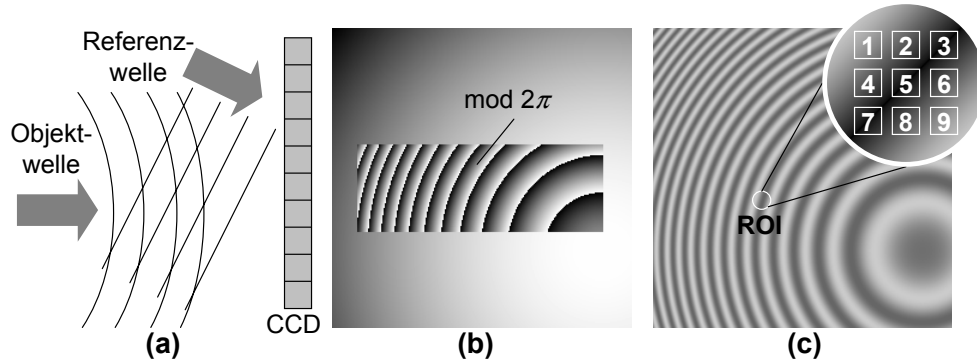


Abbildung 2.5: (a) Entstehung eines Interferogramms auf dem CCD-Sensor durch Überlagerung einer sphärischen Objekt- mit einer ebenen Referenzwelle, (b) Phasenverteilung in der Hologrammebene in Grauwertdarstellung (ausschnittsweise $\text{mod } 2\pi$), (c) Interferogramm mit einer vergrößert dargestellten 3×3 Pixel großen ROI (engl. „Region of Interest“).

2.4.3 Rekonstruktion im Ortsraum mit NDRM

Ein speziell an die mikroskopische Anordnung bei der digitalen „off-axis“ Holographie angepasstes räumliches Phasenschiebungsverfahren zur Rekonstruktion der komplexen Objektwelle (Amplitude und Phase) wird in [16, 29] vorgestellt. In der Literatur wird diese Methode einfach als „nicht-beugende Rekonstruktionsmethode“ (engl. „Non-Diffractive Reconstruction Method“, kurz: NDRM) bezeichnet. Ein wesentlicher Vorteil nicht-beugender Rekonstruktionsmethoden besteht darin, dass die durch Beugung entstehenden Terme: nullte Beugungsordnung und „Twin-Image“ nicht mit rekonstruiert werden.

Die NDRM basiert auf der Annahme, dass nur die Differenzphase $\varphi(\vec{x})$ zwischen der Objektwelle $\Psi(\vec{x})$ und der Referenzwelle $R(\vec{x}) = A_R(\vec{x}) \exp(i\varphi(\vec{x}))$ hochfrequente Änderungen der Intensität $I_H(\vec{x})$ im digitalen Hologramm verursachen, so dass die Objektwelle in der Umgebung eines Punktes $\vec{x} = (k, l)$ von M Pixeln ($i = 1, \dots, M$) als konstant angenommen werden kann (ROI in Abbildung 2.5 (c)). Mit dieser Annahme lässt sich die komplexe Objektwelle $\Psi(\vec{x})$ in der Hologrammebene am Punkt \vec{x} durch Lösen eines nichtlinearen Gleichungssystems, das aus M Gleichungen besteht, die der Interferogrammgleichung am Ort $\vec{x} + \vec{x}_i$ entsprechen, berechnen:

$$I_H(\vec{x} + \vec{x}_i) = |\Psi(\vec{x}) + A_R(\vec{x}) \exp(i\varphi(\vec{x} + \vec{x}_i))|^2 \quad (2.56)$$

mit $\Psi(\vec{x}) \approx \Psi(\vec{x} + \vec{x}_i)$
 und $A_R(\vec{x}) \approx A_R(\vec{x} + \vec{x}_i)$.

Um die Notation zu vereinfachen wird im Folgenden die Ortsabhängigkeit weg-

gelassen:

$$\begin{aligned} I_i &= |\Psi + A_R \exp(i\varphi_i)|^2 \\ &= |\Psi|^2 + A_R^2 + 2\Re(R_i^* \Psi). \end{aligned} \quad (2.57)$$

Außerdem werden die Variablensubstitutionen: $\phi = A_R \Psi$, $U = A_R^2 + \frac{1}{A_R^2} |\phi|^2$ und $V_i = R_i^* / A_R = \exp(-i\varphi_i)$ eingeführt. Anschließend kann das so umgeschriebene nichtlineare Gleichungssystem 2.57 mit der linearen Methode der kleinsten Quadrate [77] gelöst werden:

$$\arg \min_{U, \phi} \sum_i |I_i - U - 2\Re(V_i \phi)|^2. \quad (2.58)$$

Dadurch lässt sich das Problem auf das Minimierungsproblem 2.58 reduzieren. Durch Ableiten von Gleichung 2.58 nach U und ϕ ergibt sich daraus das lineare Gleichungssystem:

$$\begin{aligned} \sum_i I_i - U - 2\Re(V_i \phi) &= 0 \\ \sum_i V_i (I_i - U - 2\Re(V_i \phi)) &= 0 \\ \sum_i V_i^* (I_i - U - 2\Re(V_i \phi)) &= 0. \end{aligned} \quad (2.59)$$

Die gesuchten Größen U und ϕ des nichtlinearen Problems 2.56 sind die Lösungen dieses linearen Gleichungssystems. Durch Umstellen der Terme ergibt sich:

$$\begin{aligned} \frac{1}{M} \sum_i I_i &= U + 2\Re(\phi \frac{1}{M} \sum_i V_i) \\ \frac{1}{M} \sum_i V_i I_i &= U \frac{1}{M} \sum_i V_i + (\frac{1}{M} \sum_i V_i^2) \phi + \phi^* \\ \frac{1}{M} \sum_i V_i^* I_i &= U \frac{1}{M} \sum_i V_i^* + \phi + (\frac{1}{M} \sum_i V_i^{*2}) \phi^*. \end{aligned} \quad (2.60)$$

Weiterhin werden $v = \frac{1}{M} \sum_i V_i$, $w = \frac{1}{M} \sum_i V_i^2$, $a = \frac{1}{M} \sum_i I_i$, $b = \frac{1}{M} \sum_i V_i I_i$ und $c = \frac{1}{M} \sum_i V_i^* I_i$ substituiert und das lineare Gleichungssystem 2.59 in eine anschauliche Matrixform überführt:

$$\begin{pmatrix} 1 & v & v^* \\ v & w & 1 \\ v^* & 1 & w^* \end{pmatrix} \begin{pmatrix} U \\ \phi \\ \phi^* \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a \\ b \\ c \end{pmatrix}. \quad (2.61)$$

Schließlich wird das Gleichungssystem 2.61 nach ϕ aufgelöst und anschließend rücks substituiert ($\Psi = \phi / A_R$):

$$\Psi = \frac{1}{A_R} \frac{(b - va)(1 - v^*v) - (c - v^*a)(w - vv)}{(1 - vv^*)(1 - v^*v) - (w - vv^*)(w - vv)}. \quad (2.62)$$

Die Amplitude der Referenzwelle wird dabei als konstant angenommen, so dass sie nur als reeller Proportionalitätsfaktor in die Rechnung eingeht ($A_R(x, y) \equiv A_R$). Die Berechnung der komplexen Objektwelle erfolgt pixelweise durch Bilden der Summen v , w , a , b und c in Gleichung 2.62.

Zusätzlich zu der Intensitätsverteilung $I_H(k, l)$ des digitalen Hologramms muss für die Berechnung von Gleichung 2.62 die Phasenbeziehung zwischen Objekt- und Referenzwelle bekannt sein. Die Beschreibung erfolgt durch das mathematische Modell:

$$\varphi(k, l) = 2\pi (K_x k^2 + K_y l^2 + L_x k + L_y l). \quad (2.63)$$

Dabei beschreiben die linearen Terme mit den Koeffizienten L_x und L_y den konstanten Phasengradienten, der durch den Winkel zwischen Objekt- und Referenzwelle (β_x, β_y) der „off-axis“ Anordnung, die Wellenlänge des Laserlichts λ und den Pixelabstand des CCD-Sensors $\Delta x, \Delta y$ gegeben ist:

$$L_x = \frac{\Delta x}{2\pi} \varphi_x^{(1)} = \frac{\beta_x \Delta x}{\lambda} \quad \text{und} \quad L_y = \frac{\Delta y}{2\pi} \varphi_y^{(1)} = \frac{\beta_y \Delta y}{\lambda}. \quad (2.64)$$

Mit Hilfe der quadratischen Terme mit den Koeffizienten K_x und K_y wird ein linearer Phasengradient beschrieben, der durch Überlagerung einer sphärischen Objektwelle mit einer ebenen Referenzwelle entsteht, deren Quellpunkt den Abstand d zur Hologrammebene besitzt:

$$K_x = \frac{\Delta x^2}{2\pi} \varphi_x^{(2)} = \frac{\Delta x^2}{\lambda^2 + 2\lambda d} \quad \text{und} \quad K_y = \frac{\Delta y^2}{2\pi} \varphi_y^{(2)} = \frac{\Delta y^2}{\lambda^2 + 2\lambda d}. \quad (2.65)$$

Für den Spezialfall zweier ebener Wellen ($d \rightarrow \infty$) gilt: $K_x = 0$, $K_y = 0$. Im Wesentlichen entspricht die mathematische Beschreibung dann den in [71, 72, 73, 74, 75] beschriebenen Phasenschiebealgorithmen. Im Vergleich dazu besteht der entscheidende Vorteil der NDRM darin, dass hier kein konstanter Phasengradient der räumlichen Phasenverteilung in der Hologrammebene vorausgesetzt wird. Aus diesem Grund kann die Form der Referenzwellenfront (planar, parabolisch, etc.) und ihre Orientierung gegenüber der Objektwelle frei gewählt werden, was die Flexibilität bei der Realisierung von experimentellen Anordnungen, insbesondere bei der Verwendung von Mikroskopobjektiven zur Vergrößerung der Objektwelle, erheblich verbessert [29].

In Kapitel 3.5 wird eine im Rahmen dieser Arbeit entwickelte numerische Methode zur automatisierten Anpassung der Koeffizienten des mathematischen Modells 2.63 der räumlichen Phasenverteilung in der Hologrammebene vorgestellt. Die Koeffizienten (L_x, L_y, K_x, K_y) werden im Folgenden auch als „Rekonstruktionsparameter der NDRM“ bezeichnet.

2.4.4 Fouriertransformationmethode (FTM)

Alternativ zur Rekonstruktion im Ortsraum wird mit der Fouriertransformationmethode (kurz: FTM) die komplexe Objektwelle aus einem digitalen „off-axis“ Hologramm bzw. einem räumlich phasengeschobenen Interferogramm im Frequenzraum rekonstruiert [52, 78, 79]. Die FTM wird bei der digitalen Holographie auch zur Eliminierung von „Twin-Image“ und nullter Beugungsordnung eingesetzt. Hierbei bewirkt die spektrale Filterung durch die Unterdrückung von parasitärem Streulicht eine Kontrastverbesserung der rekonstruierten Amplitude der Objektwelle von bis zu 20 % [80, 81].

In der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Anordnung wird durch die optische Vergrößerung der Objektwelle mit einem Mikroskopobjektiv ein quadratischer Anstieg in der räumlichen Phasenverteilung der Objektwelle in der Hologrammebene erzeugt, welcher der durch das Objekt transmittierten bzw. vom Objekt reflektierten Objektwelle überlagert ist. Im Folgenden wird die Objektwelle ohne diesen quadratischen Phasenterm mit O' bezeichnet, so dass gilt:

$$O(x, y) = O'(x, y) \exp(i2\pi(\xi_\beta x^2 + \eta_\beta y^2)) \quad (2.66)$$

mit

$$\xi_\beta = \frac{\varphi_x^{(2)}}{2\pi} \quad \text{und} \quad \eta_\beta = \frac{\varphi_y^{(2)}}{2\pi}. \quad (2.67)$$

Zusätzlich erzeugt die „off-axis“ Anordnung einen konstanten Phasengradienten $(\varphi_x^{(1)}, \varphi_y^{(1)})$ der Referenzwelle in der Hologrammebene. Die Ausleuchtung des CCD-Sensors mit der Referenzwelle wird als konstant angenommen ($A_R(x, y) \equiv A_R$):

$$R(x, y) = A_R \exp(i2\pi(\xi_\alpha x + \eta_\alpha y)) \quad (2.68)$$

mit

$$\xi_\alpha = \frac{\varphi_x^{(1)}}{2\pi} \quad \text{und} \quad \eta_\alpha = \frac{\varphi_y^{(1)}}{2\pi}. \quad (2.69)$$

Durch die kohärente Überlagerung von O und R wird folgende räumliche Intensitätsverteilung generiert:

$$I_H(x, y) = \underbrace{|O'(x, y) \exp(i2\pi(\xi_\beta x^2 + \eta_\beta y^2))|}_{\text{Objektwelle } O(x, y)} + \underbrace{|A_R \exp(i2\pi(\xi_\alpha x + \eta_\alpha y))|}_{\text{Referenzwelle } R(x, y)}^2. \quad (2.70)$$

Aufgrund der quadratischen und linearen Anteile der räumlichen Phasenverteilung von Objekt- bzw. Referenzwelle wird die räumliche Intensitätsverteilung I_H von einem inhomogenen Trägerstreifenmuster überlagert (Abbildung 2.5 (c)).

Die Fouriertransformierte von Gleichung 2.70 ergibt:

$$\begin{aligned} \mathcal{F}\{I_H\}(\xi, \eta) &= \mathcal{F}\{|O|^2\}(\xi, \eta) + \mathcal{F}\{|R|^2\}(\xi, \eta) + \\ &\quad R\mathcal{F}\{O^*\}(\xi, \eta) + R^*\mathcal{F}\{O\}(\xi, \eta) \end{aligned} \quad (2.71)$$

$$\begin{aligned} &= \mathcal{F}\{|O|^2\}(\xi, \eta) + \mathcal{F}\{|A_R|^2\}\delta(\xi, \eta) + \\ &\quad A_R\mathcal{F}\{O^*\}(\xi - \xi_\alpha, \eta - \eta_\alpha) + \\ &\quad A_R^*\mathcal{F}\{O\}(\xi + \xi_\alpha, \eta + \eta_\alpha). \end{aligned} \quad (2.72)$$

Dabei bezeichnet δ die zweidimensionale δ -Funktion (Fouriertransformierte einer konstanten Funktion) und $*$ die komplexe Konjugation. Das Raumfrequenzspektrum $\mathcal{F}\{I_H\}(\xi, \eta)$ besteht aus der Überlagerung der Spektren von Objektwelle $\mathcal{F}\{|O|^2\}(\xi, \eta)$, Referenzwelle $\mathcal{F}\{|R|^2\}(\xi, \eta)$ und zwei Seitenbändern, die in der digitalen Holographie auch als „Image“ und „Twin-Image“ bezeichnet werden. Da I_H reell ist, sind die Seitenbänder punktsymmetrisch zum Ursprung. Sie sind jeweils um die Raumfrequenz $(\xi_\alpha, \eta_\alpha)$ aus dem Zentrum des Spektrums verschoben.

Die Größe der Seitenbänder wird durch den quadratischen Phasenterm der Objektwelle bestimmt und ergibt sich gemäß Gleichung 2.85 aus dem Quellpunktabstand d der Objektwelle, der Pixelanzahl des CCD-Sensors N_x, N_y , dem Pixelabstand $\Delta x, \Delta y$ und der Wellenlänge des Laserlichts λ . Im Fall einer verspeckelten Objektwelle ist der Durchmesser der Seitenbänder umgekehrt proportional zur Specklegröße [56]. Die anschließende inverse Fouriertransformation des um die Trägerfrequenz $(\xi_\alpha, \eta_\alpha)$ in den Ursprung verschobenen selektierten Teilspektrums $A_R^*\mathcal{F}\{O\}(\xi + \xi_\alpha, \eta + \eta_\alpha)$ ergibt:

$$\mathcal{F}^{-1}\{A_R^*\mathcal{F}\{O\}(\xi, \eta)\} = A_R^*O(x, y). \quad (2.73)$$

Die Verschiebung des Seitenbandes im Frequenzraum kann unter Anwendung des Verschiebungssatzes⁵ durch die Multiplikation mit einem komplexen Exponentialfaktor im Ortsraum ersetzt werden:

$$\begin{aligned} O(x, y) &= \frac{1}{A_R^*} \mathcal{F}^{-1}\{A_R^*\mathcal{F}\{O\}(\xi + \xi_\alpha, \eta + \eta_\alpha)\} \times \\ &\quad \exp(-i2\pi(\xi_\alpha x + \eta_\alpha y)). \end{aligned} \quad (2.74)$$

⁵Verschiebungssatz: $G(\xi - \xi') = g(x) \exp(i2\pi x \xi')$ mit $G(\xi) = \mathcal{F}\{g(x)\}$ [53]

Die zusätzliche Multiplikation von Gleichung 2.74 mit dem quadratischen Exponentialfaktor $\exp(-i2\pi(\xi_\beta x^2 + \eta_\beta y^2))$ liefert die Objektwelle ohne Überlagerung durch den quadratischen Phasenterm:

$$O'(x, y) = \frac{1}{A_R^*} \mathcal{F}^{-1} \{ A_R^* \mathcal{F} \{ O \} (\xi + \xi_\alpha, \eta + \eta_\alpha) \} \times \exp(-i2\pi(\xi_\alpha x + \eta_\alpha y + \xi_\beta x^2 + \eta_\beta y^2)). \quad (2.75)$$

Im Folgenden wird die Methode anhand einer eindimensionalen Simulation veranschaulicht. Hierfür sind in Abbildung 2.6 (a) und (b) die räumliche Amplituden- und Phasenverteilung einer „beliebigen“ Objektwelle $O'(x)$ aufgetragen, die hier durch aufsummierte sinusförmige Signale unterschiedlicher Frequenz und Amplitude repräsentiert werden.

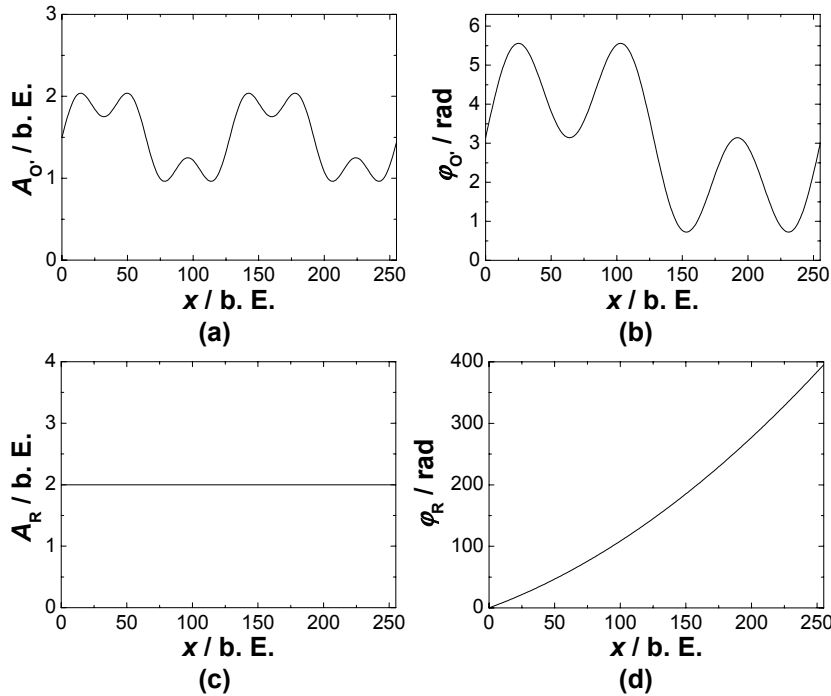


Abbildung 2.6: (a),(b) Räumliche Amplituden- und Phasenverteilung der Objektwelle, (c) räumliche Amplitudenverteilung der Referenzwelle, (d) räumliche Phasenverteilung der Referenzwelle (linearer Anteil durch „off-axis“ Geometrie, quadratischer Anteil durch sphärische Objektwelle, hier formal der Referenzwelle zugeordnet).

Analog zu den in Kapitel 3.1 beschriebenen experimentellen Anordnungen zur digitalholographischen Mikroskopie wird die Objektwelle mit einer ebenen Referenzwelle in „off-axis“ Geometrie überlagert. Die konstante räumliche Amplitudenverteilung der Referenzwelle ist in Abbildung 2.6 (c) dargestellt. Der durch

die „off-axis“ Anordnung erzeugte lineare Anstieg in der räumlichen Phasenverteilung und der durch die optische Vergrößerung der Objektwelle generierte quadratische Anstieg in der räumlichen Phasenverteilung werden hier formal der in Abbildung 2.6 (d) dargestellten räumlichen Phasenverteilung der Referenzwelle zugeordnet.

Überlagerung der in Abbildung 2.6 in Amplitude und Phase dargestellten Objekt- und Referenzwelle ergibt die in Abbildung 2.7 (a) aufgetragene räumliche Intensitätsverteilung (eindimensionales Hologramm). Aufgrund der reellen Intensitätsverteilung ist das in Abbildung 2.7 (b) logarithmisch aufgetragene Raumfrequenzspektrum symmetrisch zum Ursprung. Anschließend wird eines der Seitenbänder ausgeschnitten, was im einfachsten Fall durch Null setzen der grau hinterlegten Bereiche des Raumfrequenzspektrums erfolgt.

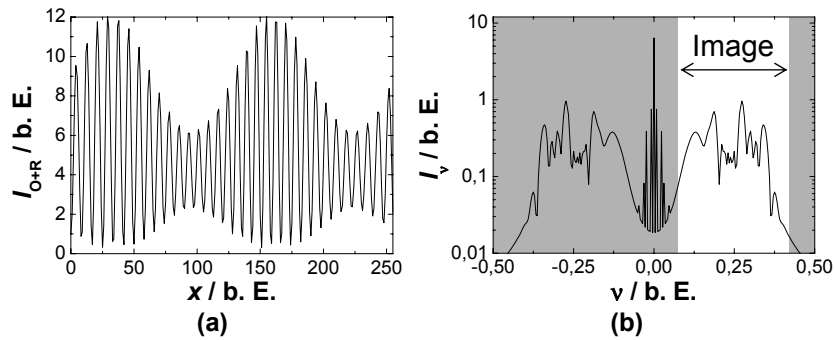


Abbildung 2.7: (a) Räumliche Intensitätsverteilung des Interferogramms der in Abbildung 2.6 dargestellten Objekt- und Referenzwelle, (b) Raumfrequenzspektrum des Interferogramms (logarithmische Skalierung).

Schließlich wird mit einer inversen Fouriertransformation zurücktransformiert. Die räumliche Amplitudenverteilung des derart im Frequenzraum gefilterten Interferogramms entspricht der Amplitude der ursprünglichen Objektwelle $|O'(x)|$ (Abbildung 2.8 (a)), während die zugehörige räumliche Phasenverteilung (Abbildung 2.8 (b)) von einem hochfrequenten Streifenmuster überlagert wird. Dieses Streifenmuster entspricht den durch die „off-axis“ Anordnung (linearer Anteil) und durch die sphärische Objektwelle (quadratischer Anteil) generierten Trägerstreifen.

Durch die Verschiebung des „Image“ in den Ursprung des Raumfrequenzspektrums des Hologramms kann nur der lineare Anteil des Trägerstreifensystems entfernt werden. Das entspricht der in der Literatur, z. B. in [52, 78, 79], beschriebenen Fouriertransformationsmethode (kurz: FTM).

Da das Trägerstreifenmuster bei der digitalholographischen Mikroskopie durch die optische Vergrößerung der Objektwelle zusätzliche quadratische Anteile ent-

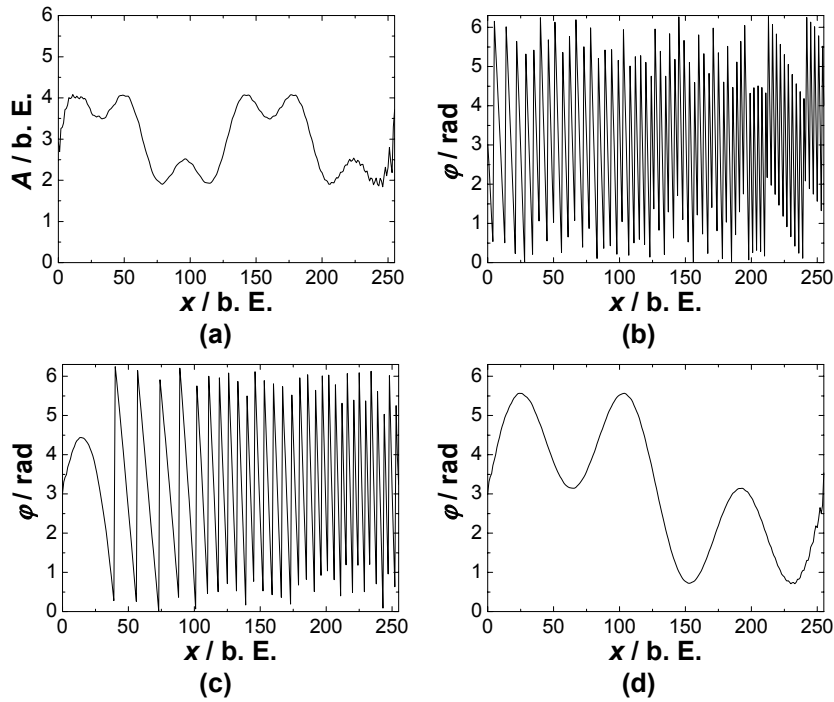


Abbildung 2.8: (a) Räumliche Amplitudenverteilung des spektral gefilterten Interferogramms (Amplitude der Objektwelle), (b) räumliche Phasenverteilung des spektral gefilterten Interferogramms, (c) Kompensation des linearen Anteils des Trägerstreifensystems durch Verschiebung des „Image“ in die Mitte des Raumfrequenzspektrums, (d) Phasenverteilung der Objektwelle durch Multiplikation der spektral gefilterten komplexen Objektwelle mit dem komplexen Exponentialfaktor E_C .

hält, reicht die Verschiebung des „Image“ zur Rekonstruktion der räumlichen Phasenverteilung der Objektwelle φ_O nicht aus, was anhand von Abbildung 2.8 (c) deutlich wird. Die dargestellte räumliche Phasenverteilung φ_O ist immer noch von einem hochfrequenten Streifenmuster überlagert. Durch die zusätzliche Multiplikation des spektral gefilterten Hologramms mit dem komplexen quadratischen Exponentialfaktor: $E_C = \exp(i(\xi_\alpha x + \xi_\beta x^2))$ wird sowohl der lineare als auch der quadratische Anteil der räumlichen Phasenverteilung kompensiert. Das in Abbildung 2.8 (d) dargestellte Ergebnis entspricht der ursprünglichen räumlichen Phasenverteilung der Objektwelle (Abbildung 2.6 (b)).

Die Rekonstruktion der komplexen Objektwelle in der Hologrammebene erfolgt demnach durch die spektrale Filterung (Ausschneiden des „Image“) und die anschließende Multiplikation mit einem komplexen Exponentialfaktor im Ortsraum, durch den sowohl die linearen als auch die quadratischen Anteile der räumlichen Phasenverteilung $\varphi(x, y)$ in der Hologrammebene kompensiert werden. Da-

bei werden nur die linearen und quadratischen Anteile entfernt, die durch das an die Geometrie des Aufbaus angepasste Modell (Gleichung 2.63) beschrieben werden.

Im Folgenden wird Gleichung 2.75, die zusätzlich zu den durch die „off-axis“ Anordnung generierten linearen Phasentermen gleichzeitig die durch die Krümmung der Objektwelle generierten quadratischen Terme eliminiert, als „erweiterte Fouriertransformationsmethode“ (kurz: eFTM) bezeichnet. In diskreter Schreibweise mit $(x, y) \rightarrow (k, l)$ und $\mathcal{F}\{g(x, y)\} \rightarrow \text{FFT}\{g(k, l)\}$ ergibt sich:

$$\Psi(k, l) = \text{FFT}^{-1}\{\text{FFT}\{I_H(k, l)\} w(v_k, v_l)\} \exp(i\varphi(k, l)). \quad (2.76)$$

Dabei wird das Ausschneiden des „Image“ aus dem Raumfrequenzspektrum des digitalen Hologramms $\mathcal{F}\{I_H(k, l)\}$ durch die Multiplikation mit der diskreten Gewichtungsfunktion $w(v_k, v_l)$ realisiert. Im einfachsten Fall ist $w(v_k, v_l)$ durch eine Rechteckfunktion, die im Bereich des „Image“ den Wert Eins und sonst den Wert Null besitzt, gegeben. Zur Unterdrückung von Artefakten, die durch die spektrale Tiefpassfilterung mit einer Rechteckfunktion entstehen, wird das „Image“ mit Hilfe der Übertragungsfunktion eines Butterworth-Filters ausgeschnitten:

$$w(v) = \frac{1}{\sqrt{1 + (v/v_0)^{2n}}}. \quad (2.77)$$

Gleichung 2.77 beschreibt die Übertragungsfunktion eines Butterworth-Filters n -ter Ordnung mit der Grenzfrequenz v_0 [53].

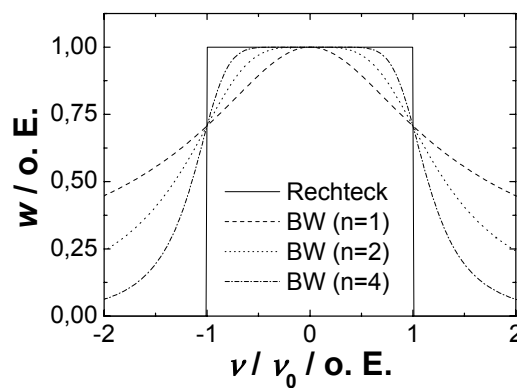


Abbildung 2.9: Rechteckfunktion und Butterworth-Filter mit $n = 1, 2, 4$.

Abbildung 2.9 zeigt zum Vergleich eine Rechteckfunktion und die Übertragungsfunktionen eines Butterworth-Filters verschiedener Ordnungen. Im Bereich

der Grenzfrequenz ν_0 fällt der Butterworth-Filter auf den Wert $1/\sqrt{2} \approx 0,7$ ab, was einer Dämpfung von ≈ 3 dB entspricht. Je größer n gewählt wird, desto steiler fallen die Flanken der Übertragungsfunktion des Butterworth-Filters ab. Für $n \rightarrow \infty$ geht Gleichung 2.77 in eine Rechteckfunktion über.

In Kapitel 4.1.2 wird die Rekonstruktion der komplexen Objektwelle in der Hologrammebene mit der eFTM und der NDRM anhand der Ergebnisse von Messungen an Test-Charts quantitativ verglichen.

2.4.5 Kombination mit diffraktiven Verfahren

In [16, 29] wird die mit der NDRM im Ortsraum (Hologrammebene, $z = 0$) rekonstruierte komplexe Objektwelle $\Psi_0(k, l)$ zur Rekonstruktion weiterer zur Hologrammebene parallel liegender Bildebenen ($\Psi_z(m, n)$, $z \neq 0$) mit der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen DFT propagiert. Um dabei störende Aliasing-Effekte zu vermeiden muss der durch Ungleichung 2.31 gegebene minimale Abstand zwischen Hologrammebene und Bildebene eingehalten werden. Da sich die Fläche der insgesamt rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilung bei der DFT linear mit dem Rekonstruktionsabstand z vergrößert (Gleichung 2.28), aber die Anzahl der diskreten Werte ($N_x \times N_y$) durch die Transformation nicht verändert wird, sinkt die Pixelauflösung mit größer werdendem Rekonstruktionsabstand [82].

Dagegen kann mit der in Kapitel 2.2.2 beschriebenen CVM die komplexe Amplitudenverteilung der Objektwelle genau in dem Bereich rekonstruiert werden, in dem bei der DFT Aliasing auftritt (Vergleich der Ungleichungen 2.31 und 2.38). Dabei bleibt das Sampling-Intervall konstant. Die Propagation mit der DFT und der CVM wird in Kapitel 4.1.3 anhand der Ergebnisse von Messungen an Test-Charts verglichen.

2.5 Zusammenhang zwischen Objektebenenabstand und Rekonstruktionsabstand

In diesem Abschnitt wird der Zusammenhang zwischen dem Rekonstruktionsabstand $z(\Delta g)$ und dem Objektebenenabstand Δg hergeleitet. Mit Objektebenenabstand wird dabei der Abstand der scharf in die Hologrammebene abgebildeten Objektebene zu der im Rekonstruktionsabstand $z(\Delta g)$ rekonstruierten Objektebene bezeichnet. Dabei müssen zwei Fälle unterschieden werden:

- (i) Direkte Rekonstruktion durch numerisches Auswerten des Beugungsintegrals mit DFT oder CVM
- (ii) Rekonstruktion der komplexen Objektwelle in der Hologrammebene mit NDRM oder eFTM und anschließende Propagation mit DFT oder CVM

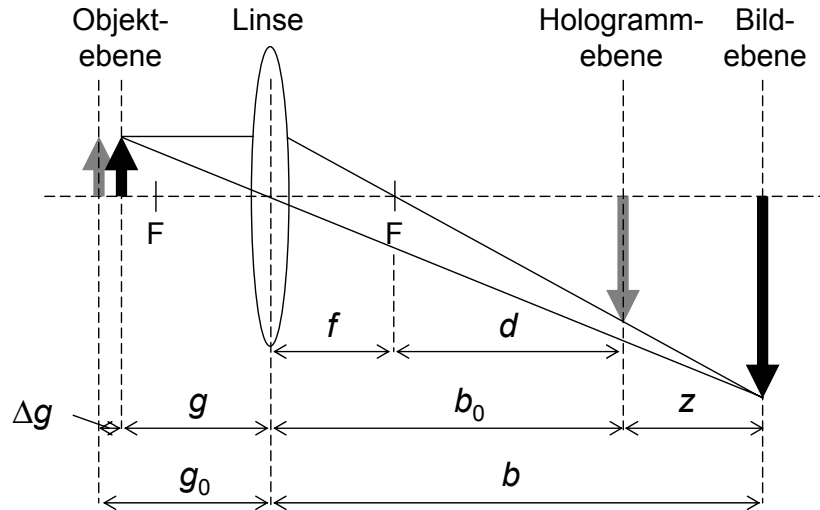


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der Geometrie bei der digitalen Holographie mit abbildendem System; F: Brennpunkt; f : Brennweite; g_0 : Abstand zwischen Objektebene und Linse bei scharfer Abbildung in die Hologrammebene; b_0 : Abstand zwischen Hologrammebene und Linse; g : Abstand zwischen Objektebene und Linse bei scharfer Abbildung in die Bildebene; b : Abstand zwischen Bildebene und Linse; d : Abstand zwischen dem Brennpunkt der Linse und der Hologrammebene; z : Rekonstruktionsabstand entsprechend der axialen Objektverschiebung Δg .

Wird bei der Aufzeichnung eines digitalen Hologramms zur Verkleinerung oder Vergrößerung der Objektwelle ein abbildendes System, z. B. eine Linse oder ein Mikroskopobjektiv, eingesetzt, wird dadurch der Rekonstruktionsabstand z beeinflusst. In Abbildung 2.10 ist die Geometrie veranschaulicht, die sich durch den Einsatz eines abbildenden Systems ergibt, das hier vereinfacht als Linse dargestellt ist. Die mathematische Beschreibung der Abbildungsgeometrie erfolgt durch die Linsengleichung:

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{g} + \frac{1}{b}. \quad (2.78)$$

2.5.1 Direkte Rekonstruktion

Wird ein digitales Hologramm direkt mit der DFT oder der CVM rekonstruiert, kann der Rekonstruktionsabstand z , der sich aus dem Objektebenenabstand Δg ,

der effektiven Brennweite des abbildenden Systems f und dem Abstand zur Hologrammebene b_0 ergibt, durch Einsetzen der in Abbildung 2.10 dargestellten Beziehungen in Gleichung 2.78 hergeleitet werden:

$$\begin{aligned}\frac{1}{f} &= \frac{1}{g_0 - \Delta g} + \frac{1}{b_0 + z} \\ z &= \frac{\Delta g (f - b_0)^2}{f^2 - b_0 \Delta g + f \Delta g}.\end{aligned}\quad (2.79)$$

Mit $d = b_0 - f$ vereinfacht sich Gleichung 2.79 zu:

$$z = \frac{\Delta g d^2}{f^2 - \Delta g d}.\quad (2.80)$$

2.5.2 Einfluss eines abbildenden Systems auf die „Image“-Größe

Für die Herleitung des Zusammenhangs zwischen Objektebenenabstand und Rekonstruktionsabstand bei der Propagation der in der Hologrammebene rekonstruierten komplexen Objektwelle in Kapitel 2.5.3 sind die folgenden Vorüberlegungen zum Einfluss eines abbildenden Systems auf die „Image“-Größe erforderlich. Dabei wird die Größe des „Image“ durch ΔI_x und ΔI_y (in Pixeln), die der nullten Beugungsordnung durch ΔZ_x und ΔZ_y (in Pixeln) bezeichnet. Für die Rekonstruktion mit der DFT ergibt sich unmittelbar aus Gleichung 2.27 für die Größe der nullten Beugungsordnung:

$$\Delta Z_x(z) = \frac{N_x^2 \Delta x^2}{\lambda z} \quad \text{bzw.} \quad \Delta Z_y(z) = \frac{N_y^2 \Delta y^2}{\lambda z}.\quad (2.81)$$

Bei kollimierter Objektbeleuchtung und ohne abbildendes System ist die Größe der nullten Beugungsordnung mit der des „Image“ und des „Twin-Image“ identisch:

$$\Delta I_x(z) = \Delta Z_x(z) \quad \text{bzw.} \quad \Delta I_y(z) = \Delta Z_y(z).\quad (2.82)$$

Wird ein abbildendes System, z. B. eine Linse oder ein Mikroskopobjektiv, zur Vergrößerung der Objektwelle eingesetzt, muss dies bei der Berechnung der Größe des „Image“ berücksichtigt werden. Mit der in Abbildung 2.11 veranschaulichten Geometrie, bei der das abbildende System vereinfacht durch eine Linse dargestellt ist, ergibt sich:

$$\Delta I_x(z) = \Delta I_x(z=0) \left(1 + \frac{z}{d}\right) \quad \text{bzw.} \quad \Delta I_y(z) = \Delta I_y(z=0) \left(1 + \frac{z}{d}\right).\quad (2.83)$$

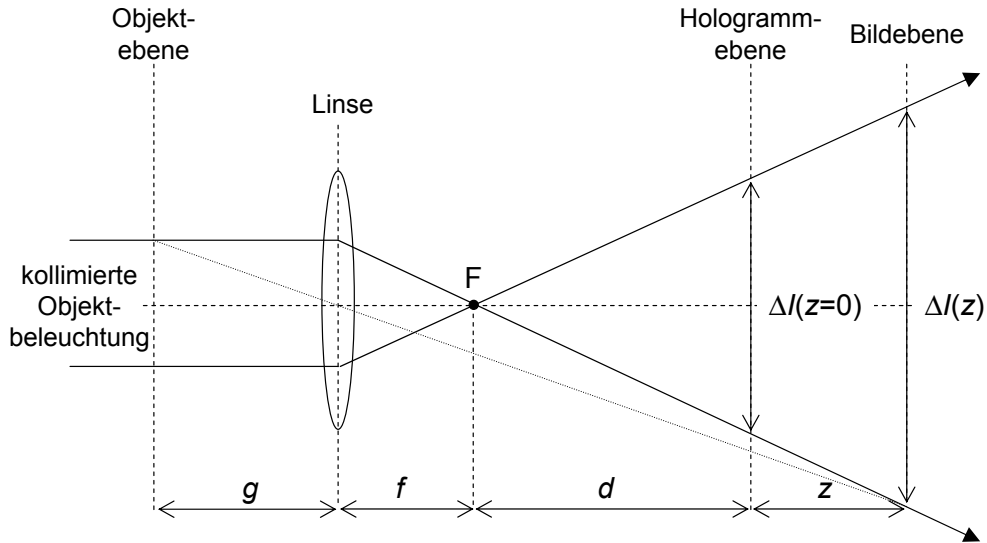


Abbildung 2.11: Durch eine Linse erzeugte sphärische Objektwelle; g : Gegenstandsweite, f : Brennweite der Linse, F : Brennpunkt, d : Quellpunktabstand der Objektwelle zur Hologrammebene, z : Abstand zwischen Hologramm- und Bildebene (Rekonstruktionsabstand), $\Delta I(z=0)$: Bildgröße in der Hologrammebene, $\Delta I(z)$: Projektion von $\Delta I(z=0)$ in die im Abstand z befindliche Bildebene.

Ersetzen von $\Delta I_{x,y}(z=0)$ durch $\Delta Z_{x,y}$ liefert:

$$\Delta I_x(z) = \frac{N_x^2 \Delta x^2}{\lambda z} \left(1 + \frac{z}{d}\right) \quad \text{bzw.} \quad \Delta I_y(z) = \frac{N_y^2 \Delta y^2}{\lambda z} \left(1 + \frac{z}{d}\right). \quad (2.84)$$

Für den Spezialfall $z \rightarrow \infty$ vereinfacht sich Gleichung 2.84 zu:

$$\Delta I_x(z \rightarrow \infty) = \frac{N_x^2 \Delta x^2}{\lambda d} \quad \text{bzw.} \quad \Delta I_y(z \rightarrow \infty) = \frac{N_y^2 \Delta y^2}{\lambda d}. \quad (2.85)$$

Außerdem vereinfacht sich die diskrete Fresneltransformation (Gleichung 2.26) für $z \rightarrow \infty$ unter Vernachlässigung der Vorfaktoren zu einer einfachen Fouriertransformation.

In Abbildung 2.12 sind exemplarisch die mit DFT rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilungen eines transparenten USAF 1951 Test-Charts, das zum Vergleich mit einer linsenlosen Anordnung und einer Anordnung mit 20x Mikroskopobjektiv ($NA = 0,4$) bei kollimierter Beleuchtung aufgezeichnet wurde, dargestellt. Während in Abbildung 2.12 (a) „Image“ und nullte Beugungsordnung gleich groß sind, ist das „Image“ in Abbildung 2.12 (b) aufgrund der sphärischen Objektwelle deutlich größer als die nullte Beugungsordnung.

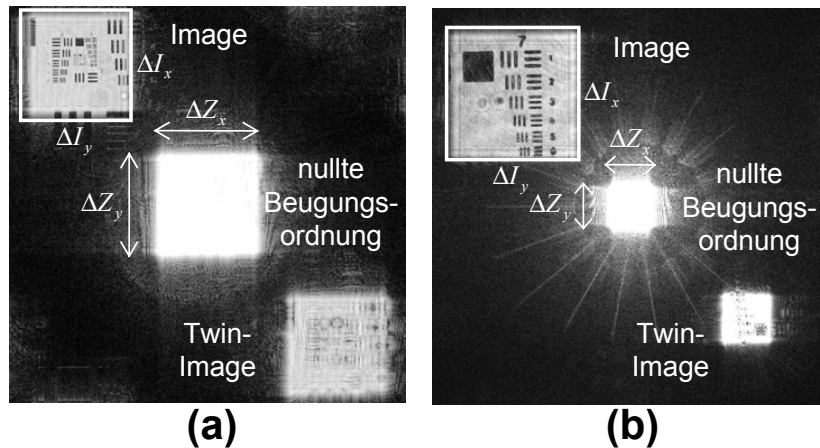


Abbildung 2.12: Mit DFT rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung (logarithmische Darstellung) eines transparenten USAF 1951 Test-Charts: (a) linsenlose Anordnung, (b) Objektwelle mit einem 20x Mikroskopobjektiv ($NA = 0,4$) vergrößert.

Die Überlegungen in diesem Abschnitt beziehen sich auf die direkte Rekonstruktion mit DFT. Im Gegensatz dazu bleibt bei der direkten Rekonstruktion mit CVM das Sampling-Intervall konstant (Gleichung 2.39), so dass die Größe der nullten Beugungsordnung nicht durch Gleichung 2.81 gegeben ist. Eine separate Herleitung der „Image“-Größe für die CVM ist für die Überlegungen in Kapitel 2.5.3 aber nicht erforderlich, da der Rekonstruktionsabstand unabhängig davon ist, ob die DFT oder die CVM zur Rekonstruktion eingesetzt wird.

2.5.3 Propagation der komplexen Objektwelle

Wird ein digitales Hologramm mit der NDRM oder der eFTM in der Hologrammebene rekonstruiert, werden die durch das mathematische Modell 2.63 der Phasenverteilung in der Hologrammebene beschriebenen Phasenterme aus der Objektwelle $\Psi_0(x,y)$ eliminiert. Wird $\Psi_0(x,y)$ anschließend zur Rekonstruktion weiterer Objektebenen mit der DFT oder der CVM propagiert, muss das bei der Berechnung des Rekonstruktionsabstandes berücksichtigt werden. So wird z. B. eine ursprünglich durch die Vergrößerung mit einer Linse divergente Objektwelle nach der Rekonstruktion in der Hologrammebene als kollimierte Welle propagiert.

In diesem Abschnitt wird die Beziehung zwischen Objektebenenabstand Δg und Propagationslänge z' abgeleitet. Dabei werden alle Größen, die sich auf die Propagation der zuvor in der Hologrammebene rekonstruierten komplexen Objektwelle beziehen, mit einem Strich (') gekennzeichnet.

Die Breite eines direkt mit der DFT rekonstruierten „Image“ (Pixel) ist durch Gleichung 2.84 gegeben. Das Eliminieren der quadratischen Phasenterme aus der Objektwelle durch die Rekonstruktion in der Hologrammebene ist mathematisch gleichbedeutend mit der Verlagerung des Quellpunktes der Objektwelle ins Unendliche (Abbildung 2.11, $d \rightarrow \infty$). Für die Breite des „Image“ $\Delta I'_x$ (Pixel) nach der Propagation mit DFT ergibt sich demzufolge:

$$\Delta I'_x(z', d \rightarrow \infty) = \frac{N_x^2 \Delta x^2}{\lambda z'}, \quad (2.86)$$

was erwartungsgemäß der Breite der nullten Beugungsordnung entspricht (Gleichung 2.81). Gleichsetzen der Gleichungen 2.84 und 2.86 und Auflösen nach der Propagationslänge z' ergibt:

$$\begin{aligned} \Delta I_x(z, d) &= \Delta I'_x(z') \\ \frac{N_x^2 \Delta x^2}{\lambda z} \left(1 + \frac{z}{d}\right) &= \frac{N_x^2 \Delta x^2}{\lambda z'} \\ z' &= \frac{dz}{d+z}. \end{aligned} \quad (2.87)$$

Der Abstand des Quellpunktes der Objektwelle zur Hologrammebene d kann experimentell nur mit großem Aufwand bestimmt werden. Für die in Kapitel 4.3.3 dargestellten Ergebnisse ist es aber erforderlich die Größe d möglichst genau zu kennen. Daher ist es sinnvoll d durch einen der quadratischen Koeffizienten (K_x bzw. K_y) des mathematischen Modells 2.63 der räumlichen Phasenverteilung in der Hologrammebene zu beschreiben. Dafür wird zunächst Gleichung 2.53 nach d aufgelöst und anschließend die Ersetzung $\phi_{x,y}^{(2)} = 2\pi K_{x,y}$ vorgenommen:

$$d = \frac{1}{2} \left(\frac{\Delta x^2}{\lambda K_x} - \lambda \right) \quad \text{bzw.} \quad d = \frac{1}{2} \left(\frac{\Delta y^2}{\lambda K_y} - \lambda \right). \quad (2.88)$$

Einsetzen der Gleichungen 2.80 und 2.88 in Gleichung 2.87 ergibt die Beziehung zwischen Propagationslänge z' und dem Objektebenenabstand Δg (exemplarisch für K_x):

$$z' = \left(\frac{\Delta x^2 - \lambda^2 K_x}{2f\lambda K_x} \right)^2 \Delta g. \quad (2.89)$$

Die experimentelle Verifizierung der Beziehungen 2.80 und 2.89 erfolgt in Kapitel 4.3.3.

3 Experimentelle Methoden

In diesem Abschnitt werden die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und angewendeten experimentellen Methoden beschrieben. Zuerst erfolgt die schematische Darstellung und Beschreibung der zur digitalholographischen Mikroskopie in Durchlicht- und Auflichtanordnung realisierten Experimentalaufbauten. Anschließend werden einige grundlegende mathematische Zusammenhänge zur weiteren quantitativen Auswertung der rekonstruierten komplexen Objektwelle vorgestellt. Es folgt die Beschreibung einer Methode zum Filtern und Entfalten von $\text{mod } 2\pi$ vorliegenden Daten. Schließlich wird ein im Rahmen dieser Arbeit entwickeltes Verfahren zum automatisierten Anpassen der Rekonstruktionsparameter für die Rekonstruktion in der Hologrammebene vorgestellt.

3.1 Experimenteller Aufbau zur digitalholographischen Mikroskopie

Ziel dieser Arbeit ist die digitalholographische Untersuchung von Lebensvorgängen auf zellulärer Ebene. Dafür sind Experimente vorgesehen, anhand derer quantitative Aussagen über die räumliche Dickenverteilung und den Brechungsindex von lebenden Zellen gemacht werden können. Grundlegende Voraussetzung für Messungen an Zellen ist eine laterale Auflösung, die mit der Hellfeld-Mikroskopie vergleichbar ist ($\lesssim 1 \mu\text{m}$). Die Analyse (stimulierter) dynamischer Vorgänge erfordert darüber hinaus eine angepasste zeitliche Auflösung der Hologrammaufnahme in oder nahe der Videowiederholrate. Weiterhin ist die on-line Visualisierung der rekonstruierten Objektwelle (räumliche Amplituden- und Phasenverteilung) von großem Vorteil für das experimentelle Arbeiten.

3.1.1 Durchlichtanordnung zur digitalholographischen Mikroskopie

Da Zellen im ungefärbten Zustand nahezu vollständig transparent erscheinen, wird ein Aufbau zur digitalholographischen Mikroskopie in Durchlichtanord-

nung realisiert. Abbildung 3.1 zeigt ein hierfür modifiziertes „Mach-Zehnder“-Interferometer. Das von einem frequenzverdoppelten Nd:YAG Laser (COMPASS 315M-100, Coherent) emittierte Licht ($\lambda = 532 \text{ nm}$, $P = 5 \text{ mW} - 100 \text{ mW}$ stufenlos regelbar) wird von einem Strahlteiler (ST1) in eine Objekt- und eine Referenzwelle aufgeteilt, deren Intensitäten durch Graufilter abgeschwächt werden können. Danach werden beide Wellen zur Raumfrequenzfilterung mit einem Mikroskopobjektiv (20x, $\text{NA} = 0,4$) auf ein Pinhole ($10 \mu\text{m}$ Durchmesser) fokussiert. Die Referenzwelle wird anschließend mit einer plankonvexen Linse (Brennweite 100 mm) kollimiert, so dass die numerische Rekonstruktion mit dem mathematischen Modell einer ebenen Referenzwelle durchgeführt werden kann, z. B. mit der durch Gleichung 2.26 beschriebenen DFT.

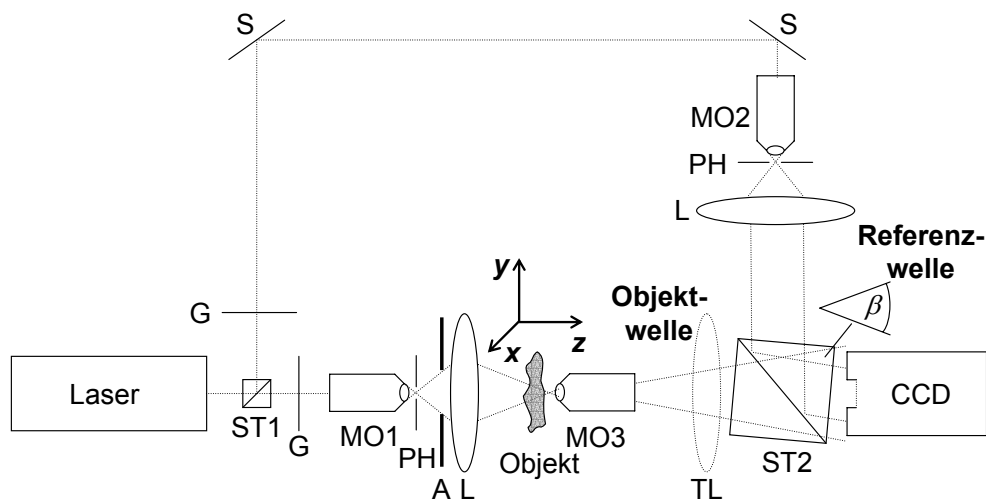


Abbildung 3.1: Optischer Aufbau zur digitalholographischen Mikroskopie in Durchlichtanordnung; ST1,2: Strahlteilerwürfel, S: Spiegel, G: Graufilter, MO1,2: Mikroskopobjektive (Raumfrequenzfilterung), MO3: Mikroskopobjektiv (Vergrößerung der Objektwelle), PH: Pinhole, A: Aperturblende, L: Linse, TL: Tubuslinse (optional), CCD: CCD-Kamera.

Die Objektbeleuchtung ist zur Minimierung von Streulicht der in der Mikroskopie gebräuchlichen Köhlerschen Beleuchtung¹ nachempfunden. Dazu wird mit einer Plankonvex-Linse (Brennweite 50 mm), die als Kondensor fungiert, in der Objektebene ein Beleuchtungsfleck erzeugt, der gerade so groß ist, dass nur der auf den CCD-Sensor abgebildete Bereich beleuchtet wird. Zusätzlich wird um Streulicht auszublenden eine Aperturblende in den Aufbau integriert. Mit Hilfe

¹August Köhler löste das Problem des Streu- und Reflexlichts im Jahre 1893. Mit Hilfe einer Leuchtfeldblende zwischen Lichtquelle und Kondensorlinse wird statt einer tatsächlichen Blende in der Objektebene das Bild einer Blende in die Objektebene abgebildet.

des Kondensors und der Aperturblende kann das Objekt mit einem an die numerische Apertur des Mikroskopobjektivs angepassten Lichtkegel beleuchtet werden. In Kapitel 4.3.2 werden Ergebnisse von Messungen, die unter Einsatz dieser Art der Beleuchtung durchgeführt wurden, mit Resultaten ohne eine optimierte Objektbeleuchtung verglichen. Weitere Informationen zu den Grundlagen der mikroskopischen Beleuchtung sind in der zu diesem Thema umfangreich vorhandenen Fachliteratur zu finden, z. B. [83, 84].

Für die Durchführung der Experimente im Rahmen dieser Arbeit stehen Mikroskopobjektive zur Verfügung, die für eine Abbildung in die Zwischenbildebene² oder für eine Abbildung ins Unendliche optimiert sind. Der CCD-Sensor wird daher in der Zwischenbildebene platziert, so dass der Abstand zwischen Mikroskopobjektiv und CCD-Sensor der mechanischen Tubuslänge (160 mm) von Standard-Mikroskopen entspricht. Bei der Verwendung von Mikroskopobjektiven, die scharf ins Unendliche abbilden, wird zusätzlich eine bikonvexe Linse (Brennweite 160 mm), die in der Mikroskopie auch als Tubuslinse bezeichnet wird, in den Strahlengang integriert. Die Tubuslinse bildet das reelle Bild des Objekts aus dem Unendlichen wieder scharf in die Zwischenbildebene ab, so dass die Kombination aus Mikroskopobjektiv und Tubuslinse wie ein Objektiv wirkt, das für eine Abbildung in die Zwischenbildebene konstruiert wurde.

Die holographische „off-axis“ Anordnung wird dadurch realisiert, dass die Referenzwelle der Objektwelle mit Hilfe eines verkippten Strahlteilerwürfels überlagert wird. Um ein Unterabtasten und damit verbundenes Aliasing der entstehenden Interferenzstreifen, die auch als „Trägerstreifen“ bezeichnet werden, zu verhindern, darf der Winkel $\beta_{\max} = \sin^{-1} \left(\frac{\lambda}{2\Delta x} \right)$ zwischen Objekt- und Referenzwelle nicht überschritten werden [11, 52]. Andererseits erfordert die räumliche Trennung von „Image“ und nullter Beugungsordnung, dass der Winkel $\beta_{\min} = \tan^{-1} \left(\frac{N_x \Delta x}{2z} \right)$ nicht unterschritten wird [13, 85].

3.1.2 Auflichtanordnung zur digitalholographischen Mikroskopie

Da im Rahmen dieser Arbeit auch Messungen an reflektiven technischen Objekten, die hauptsächlich zur Charakterisierung der Messgenauigkeit des Verfahrens dienen, durchgeführt werden, wird ein weiterer Experimentalaufbau gemäß Ab-

²Die mikroskopische Vergrößerung erfolgt in zwei Stufen. Zunächst wird das vergrößerte Bild des Präparates mit einem Objektiv in die Zwischenbildebene abgebildet. Zur Beobachtung wird dieses Bild (=Zwischenbild) durch das als Lupe wirkende Okular betrachtet.

bildung 3.2 in Auflichtanordnung realisiert. Um dabei die Objektoberfläche optimal auszuleuchten wird die Beleuchtung durch das zur Vergrößerung der Objektwelle eingesetzte Mikroskopobjektiv realisiert.

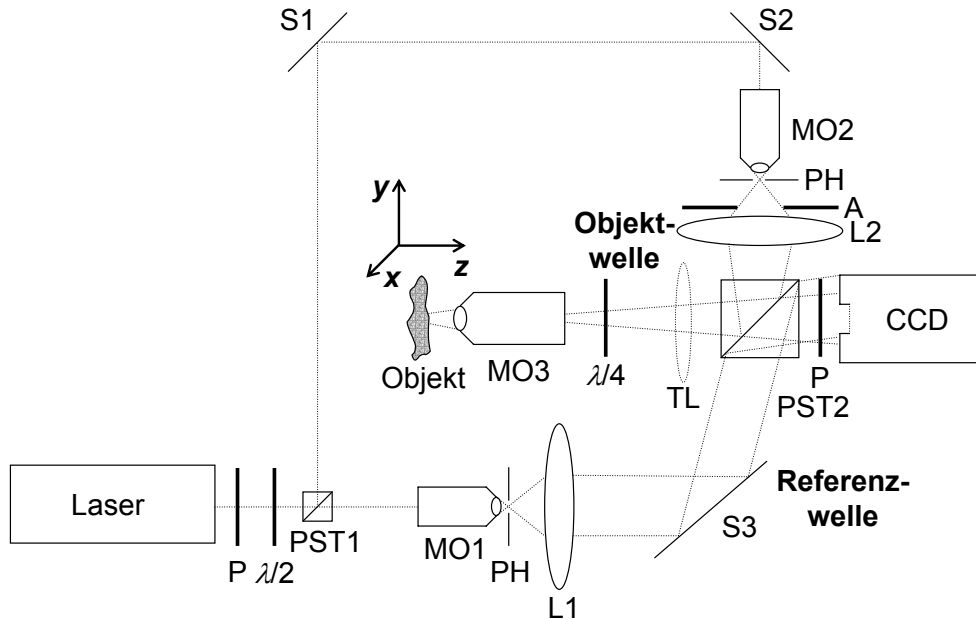


Abbildung 3.2: Optischer Aufbau zur digitalholographischen Mikroskopie in Auflichtanordnung; PST1,2: Polarisierender Strahlteilerwürfel, P: Polarisationsfilter, $\lambda/2$: Halbwellenplatte, $\lambda/4$: Viertelwellenplatte, S1,2,3: Spiegel, G: Graufilter, MO1,2: Mikroskopobjektive (Raumfrequenzfilterung), MO3: Mikroskopobjektiv (Beleuchtung und Vergrößerung der Objektwelle), PH: Pinhole, A: Aperturblende, L1,2: Linsen, TL: Tubuslinse (optional), CCD: CCD-Kamera.

Durch die Verwendung von zwei polarisierenden Strahlteilerwürfeln in Kombination mit einer $\lambda/4$ -Platte werden Reflexe am Strahlteilerwürfel (PST2) und an der Tubuslinse (TL) reduziert. Das zweimalige Passieren einer $\lambda/4$ -Platte in entgegengesetzter Richtung von zuvor linear polarisiertem Licht dreht die Polarisationsrichtung um 90° . Da Reflexe, die am Strahlteilerwürfel (PST2) und an der Tubuslinse (TL) entstehen, dazu senkrecht polarisiert sind, werden sie vom polarisierenden Strahlteilerwürfel (PST2) abgelenkt und gelangen nicht auf den CCD-Sensor. Hierfür wird die $\lambda/4$ -Platte so orientiert, dass das Objekt mit zirkular polarisiertem Licht beleuchtet wird. Reflexe, die am Mikroskopobjektiv (MO3) entstehen, werden auf diese Weise nicht reduziert. Durch Justage der Linse (L2) und der Aperturblende (A) ist es aber möglich diese zu minimieren. Ergebnisse von Messungen in Auflichtanordnung mit optimierter Objektbeleuchtung sind in Kapitel 4.3.2 dargestellt.

Eine $\lambda/2$ -Platte vor PST1 ermöglicht das Anpassen des Intensitätsverhältnisses

zwischen Objekt- und Referenzwelle. Die „off-axis“ Geometrie wird hier durch Verkippen des Spiegels (S3) realisiert.

Die in den Abbildungen 3.1 (Durchlicht) und 3.2 (Auflicht) dargestellten Experimentalaufbauten können in der Praxis auch in einem kombinierten Aufbau realisiert werden. Mit Hilfe von mechanischen Shuttern kann wahlweise die Durchlicht- oder die Auflichtbeleuchtung des Objekts ausgeblendet werden.

3.1.3 Digitalisierung der Hologramme

Die Digitalisierung der Hologramme erfolgt durch eine hochauflösende CCD-Kamera. Dabei werden folgende Modelle eingesetzt: PCO Sensicam mit zugehöriger PCI Bilderfassungskarte (12 bit), Sony XCD-X700 und Sony XCD-SX900 mit IEEE1394 Schnittstelle (8 bit). Die technischen Daten der CCD-Kameras sind im Anhang A.1 aufgelistet. Für eine Beschreibung des Messprinzips von CCD-Sensoren wird auf die zu diesem Thema vorhandene Fachliteratur verwiesen, z. B. [86, 87, 88].

Das von der digitalen CCD-Kamera aufgezeichnete Bild wird über die zugehörige Bilderfassungskarte bzw. über die IEEE1394 Schnittstelle an einen Computer mit Intel Pentium 4 Prozessor, 2,8 GHz und 2 GB Ram zur weiteren Bildverarbeitung übertragen. Dort werden die digitalen Hologramme als 16 bit Bild im B16-Format (PCO Sensicam) bzw. als 8 bit Bild im BMP-Format (Kameras mit IEEE1394 Schnittstelle) auf einer Festplatte gespeichert.

Für die Justage des Aufbaus und die Visualisierung dynamischer Vorgänge ist eine on-line Bildgebung der rekonstruierten räumlichen Amplituden- und Phasenverteilungen erforderlich. Dazu wird in die Software zur numerischen Rekonstruktion eine Schnittstelle implementiert, die den Zugriff auf die über die IEEE1394 Schnittstelle übertragenen Bildinformationen ermöglicht. Die detaillierte Beschreibung der Software erfolgt im Anhang A.2.

3.2 Weiterverarbeitung der rekonstruierten komplexen Objektwelle

Die rekonstruierte komplexe Objektwelle $\Psi(x, y)$ wird zur Weiterverarbeitung und Darstellung in Amplitude $E(x, y)$ und Phase $\varphi(x, y)$ aufgespalten. Die Berechnung der räumlichen Amplitudenverteilung erfolgt mit:

$$E(x, y) = \sqrt{\Re\{\Psi(x, y)\}^2 + \Im\{\Psi(x, y)\}^2}. \quad (3.1)$$

Die räumliche Phasenverteilung wird mit der Arcustangens-Funktion berechnet, deren Wertebereich auf das Intervall $-\pi/2$ bis $\pi/2$ beschränkt ist:

$$\varphi(x, y) = \tan^{-1} \frac{\Im\{\Psi(x, y)\}}{\Re\{\Psi(x, y)\}}. \quad (3.2)$$

Durch die Berücksichtigung der Vorzeichen von Imaginär- und Realteil (Zähler und Nenner) ist eine Erweiterung auf das Intervall $-\pi$ bis π möglich (Ortsabhängigkeiten für eine einfache Notation vernachlässigt) [8, 52]:

$$\varphi = \begin{cases} -\tan^{-1} \frac{\Im\{\Psi\}}{\Re\{\Psi\}} - \frac{\pi}{2} & \text{für } \Im\{\Psi\} \leq 0, \Re\{\Psi\} < 0 \\ +\tan^{-1} \frac{\Im\{\Psi\}}{\Re\{\Psi\}} & \text{für } \Im\{\Psi\} \leq 0, \Re\{\Psi\} > 0 \\ +\tan^{-1} \frac{\Im\{\Psi\}}{\Re\{\Psi\}} & \text{für } \Im\{\Psi\} \geq 0, \Re\{\Psi\} > 0 \\ -\tan^{-1} \frac{\Im\{\Psi\}}{\Re\{\Psi\}} + \frac{\pi}{2} & \text{für } \Im\{\Psi\} \geq 0, \Re\{\Psi\} < 0 \end{cases}. \quad (3.3)$$

Die Anordnung des experimentellen Aufbaus muss bei der quantitativen Auswertung von digitalholographisch rekonstruierten Phasenverteilungen berücksichtigt werden. Dabei wird zwischen der in Abbildung 3.1 dargestellten Durchlichtanordnung und der in Abbildung 3.2 skizzierten Auflichtanordnung unterschieden.

Für den Fall eines in Durchlichtanordnung aufgezeichneten Hologramms repräsentiert die rekonstruierte räumliche Phasenverteilung der Objektwelle die in Richtung der Objektbeleuchtung (z -Richtung) integral gemessene räumliche Verteilung des Brechungsindex in der Objektebene mod 2π . Die Quantifizierung der Dicke eines transparenten Objekts erfordert daher die Kenntnis der räumlichen Brechungsindexverteilung des Objekts $n_O(x, y, z)$.

Weiterhin handelt es sich bei $\varphi(x, y)$ nur um eine relative Größe. Deshalb ist zur Bestimmung der durch das Objekt gegenüber dem umgebenden Medium erzeugten räumlichen Differenzphasenverteilung ein fester Bezugspunkt ($\varphi_0 = \text{konst.}$) notwendig:

$$\Delta\varphi(x, y) = \varphi(x, y) - \varphi_0. \quad (3.4)$$

In der experimentellen Praxis ist ein solcher Bezugspunkt meist durch einen Bereich in der rekonstruierten räumlichen Phasenverteilung gegeben, der keine Objektinformation enthält. Die räumliche Dickenverteilung $z_O(x, y)$ des Objekts ist gegeben durch:

$$z_O(x, y) = \frac{\lambda \Delta\varphi(x, y)}{2\pi |n_M - \overline{n_O(x, y)}|} \quad (3.5)$$

$$\text{mit } \overline{n_O(x, y)} = \frac{1}{z_O(x, y)} \int n_O(x, y, z) dz. \quad (3.6)$$

Dabei wird der Brechungsindex des umgebenden Mediums n_M als räumlich homogen angenommen. Für den Spezialfall eines Objekts mit ebenfalls homogener Brechungsindexverteilung ($n_O \equiv n_O(x, y, z)$) vereinfacht sich Gleichung 3.5 zu:

$$z_O(x, y) = \frac{\lambda \Delta \varphi(x, y)}{2\pi |n_M - n_O|}. \quad (3.7)$$

Im umgekehrten Fall lässt sich durch Umstellen von Gleichung 3.5 bei bekannter Dicke des Objekts z_O der integrale Brechungsindex $\overline{n_O}$ bzw. dessen Variation bestimmen (Kapitel 4.4.3).

Werden Hologramme eines reflektiven Objekts in Auflichtanordnung mit parallel zur optischen Achse einfallender Objektbeleuchtung aufgezeichnet, repräsentiert die rekonstruierte räumliche Phasenverteilung (mod 2π) dessen Topographie z_T . Zusätzlich ist dabei der Faktor 2, der durch die zum Objekt hin- und vom Objekt weglaufende Objektwelle generiert wird, zu berücksichtigen:

$$z_T(x, y) = \frac{\varphi(x, y)}{4\pi} \lambda n_M. \quad (3.8)$$

Die räumliche Brechungsindexverteilung des umgebenden Mediums wird in Gleichung 3.8 ebenfalls als räumlich homogen vorausgesetzt: $n_M = n_M(x, y, z)$.

3.3 Tiefpassfilterung von Phasenverteilungen

Eine effektive und einfach zu implementierende Methode statistisches Rauschen in einer mod 2π vorliegenden diskreten räumlichen Phasenverteilung $\varphi(k, l)$ zu minimieren wird in [89] beschrieben. Die Filterung erfolgt in folgenden Schritten:

- (i) Transformation der mod 2π vorliegenden Bildinformation in zyklische Koordinaten durch Zerlegung von $\varphi(k, l)$ in ihre Sinus- und Kosinuskomponente (Quadraturkomponenten): $\varphi_{\sin}(k, l) = \sin(\varphi(k, l))$, $\varphi_{\cos}(k, l) = \cos(\varphi(k, l))$,
- (ii) Separate Tiefpassfilterung der Sinus- und Kosinuskomponente (siehe nächster Absatz),
- (iii) Rücktransformation in das ursprüngliche Koordinatensystem:
 $\varphi(k, l) = \tan^{-1} \left(\overline{\varphi_{\cos}(k, l)} / \overline{\varphi_{\sin}(k, l)} \right)$, unter Berücksichtigung der Vorzeichen von Zähler und Nenner für eine richtige Abbildung auf das Intervall $[-\pi, \pi]$ (Gleichung 3.3).

In der Fachliteratur, z. B. [53, 90, 91], werden zahlreiche Variationen der Tiefpassfilterung von zweidimensional vorliegenden Daten beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wird für die Tiefpassfilterung der Quadraturkomponenten der räumlichen Phasenverteilung ein „gleitender“ Mittelwertfilter eingesetzt:

$$\begin{aligned}\overline{\varphi_{\sin}(k,l)} &= \frac{1}{(2R_{\text{GL}} + 1)^2} \sum_{m=k-R_{\text{GL}}}^{k+R_{\text{GL}}} \sum_{n=l-R_{\text{GL}}}^{l+R_{\text{GL}}} \varphi_{\sin}(m,n) \\ \overline{\varphi_{\cos}(k,l)} &= \frac{1}{(2R_{\text{GL}} + 1)^2} \sum_{m=k-R_{\text{GL}}}^{k+R_{\text{GL}}} \sum_{n=l-R_{\text{GL}}}^{l+R_{\text{GL}}} \varphi_{\cos}(m,n) \quad (3.9) \\ \text{für } k &= R_{\text{GL}}, \dots, N_x - R_{\text{GL}} - 1 \\ \text{und } l &= R_{\text{GL}}, \dots, N_y - R_{\text{GL}} - 1.\end{aligned}$$

Dabei wird der „Radius“ des quadratischen Bereichs, dessen Mittelwert für jedes Element des Arrays berechnet wird, mit R_{GL} bezeichnet. Der Parameter R_{GL} und die Anzahl der Glättungen N_{GL} werden individuell angepasst.

3.4 Entfalten von Phasenverteilungen

Zur weiteren quantitativen Auswertung sowie für eine anschauliche Darstellung der Messdaten ist es oftmals erforderlich eine mod 2π vorliegende rekonstruierte räumliche Phasenverteilung zu verstetigen. Dieser Vorgang wird als „Entfalten“ (engl. „Unwrapping“) bezeichnet.

Um Entfaltungsfehler zu vermeiden ist es ggf. erforderlich zuvor durch eine Tiefpassfilterung das statistische Rauschen der Phasenverteilung zu minimieren. Dabei müssen die 2π -Phasensprünge erhalten bleiben (Kapitel 3.3).

Obwohl der Schwerpunkt dieser Arbeit nicht auf der Entwicklung von Entfaltungsalgorithmen liegt, wird ein einfacher Algorithmus zum linienweisen Entfalten von mod 2π vorliegenden Phasenverteilungen in die Rekonstruktionssoftware integriert, da dies für eine automatisierte Auswertung und zum Anpassen der Rekonstruktionsparameter (Kapitel 3.5.2) erforderlich ist. Die zum Entfalten der einzelnen Linien notwendige Detektion der 2π -Phasensprünge wird dabei durch Bilden der Differenz benachbarter Phasenwerte realisiert (numerisches Differenzieren). Überschreitet die Differenz einen vorgegebenen Schwellwert ($\approx \pi$, empirischer Wert), wird je nach Vorzeichen 2π auf alle folgenden Phasenwerte addiert bzw. subtrahiert.

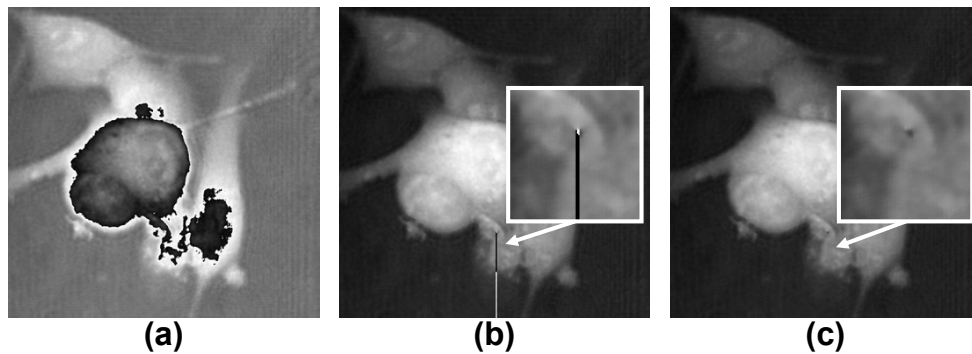


Abbildung 3.3: Rekonstruierte räumliche Phasenverteilung von Leberkarzinomzellen: (a) mod 2π , (b) linienweise entfaltet, die Ausschnittsvergrößerung zeigt falsch entfaltete Phasenwerte, (c) linienweise entfaltet mit Kontrolle, der Fehler aus (b) wird vom Algorithmus erkannt und korrigiert.

In einem zweiten Schritt werden fehlerhaft entfaltete Phasenwerte detektiert. Dazu werden die speziell bei den durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen vorliegenden Gegebenheiten ausgenutzt. Im Allgemeinen befindet sich dabei ein Untersuchungsobjekt, z. B. eine Zelle oder ein Zellverband, im zentralen Bereich der rekonstruierten räumlichen Phasenverteilung, so dass in deren Randbereich keine Singularitäten und damit keine Phasensprünge auftreten (Abbildung 3.3 (a)). Wird beim linienweisen Entfalten ein Phasensprung nicht korrekt detektiert, weichen die folgenden Phasenwerte entlang dieser Linie um ein ganzzahliges Vielfaches von 2π von der Umgebung ab (Abbildung 3.3 (b)).

Zur Detektion von falsch entfaltenen Linien werden die Phasenwerte entlang einer geschlossenen Kurve durch die mod 2π vorliegende Phasenverteilung um das Untersuchungsobjekt mit den Phasenwerten der Kurve durch die entfaltete Phasenverteilung verglichen. Bei einem Entfaltungsfehler weichen die Phasenwerte beider Kurven an dieser Stelle um ein Vielfaches von 2π ab. In Abbildung 3.3 (c) wird die falsch entfaltete Linie detektiert und pixelweise durch den Mittelwert der benachbarten richtig entfaltenen Linien ersetzt.

Für weiterführende Informationen zu Entfaltungsalgorithmen wird auf die zu diesem Thema vorhandene Fachliteratur verwiesen, z. B. [52, 92].

3.5 Anpassen der Rekonstruktionsparameter

Für die in den Kapiteln 2.4.3 und 2.4.4 beschriebenen nicht-beugenden Rekonstruktionsverfahren (NDRM und eFTM) ist die Kenntnis der Phasenverteilung

$\varphi(x,y)$ in der Hologrammebene erforderlich, die durch die kohärente Überlagerung der das Objekt beleuchtenden Welle mit der Referenzwelle gegeben ist. Mathematisch wird $\varphi(x,y)$ hier durch ein zweidimensionales Polynom zweiten Grades beschrieben (Gleichung 2.63). Die Koeffizienten dieses Polynoms werden als Rekonstruktionsparameter bezeichnet und müssen an die experimentelle Anordnung angepasst werden. Im Folgenden wird ein hierzu entwickeltes automatisiertes Verfahren beschrieben.

3.5.1 Bestimmung von Näherungswerten

Für die Bestimmung der Rekonstruktionsparameter der in Abbildung 3.1 dargestellten Durchlichtanordnung ist ein Hologramm erforderlich, das vorzugsweise ohne Objekt aufgezeichnet wird. Bei der in Abbildung 3.2 skizzierten Auflichtanordnung wird dafür ein reflektives Objekt mit glatter Oberfläche, z. B. ein Spiegel, in der Objektebene positioniert. In beiden Fällen ist dann mit einer ebenen Referenzwelle die Phasenverteilung in der Hologrammebene $\varphi(x,y)$ allein durch die „off-axis“ Anordnung und die Krümmung der Objektwelle gegeben. In Kapitel 4.2.3 wird anhand von Messergebnissen gezeigt, dass es nur dann erforderlich ist ein Hologramm ohne Objekt aufzunehmen, wenn die Objektstrukturen den gesamten Bildbereich überdecken.

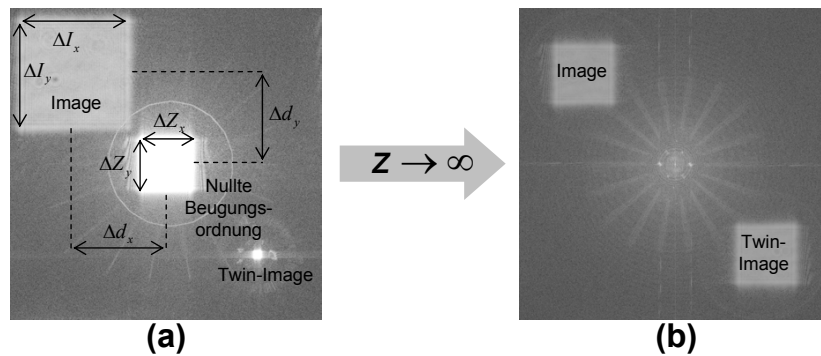


Abbildung 3.4: (a) Räumliche Amplitudenverteilung (logarithmische Darstellung) eines mit der DFT rekonstruierten „off-axis“ Hologramms (ohne Objekt), (b) räumliche Amplitudenverteilung (logarithmische Darstellung) des mit der FFT berechneten Raumfrequenzspektrums des Hologramms.

Das aufgezeichnete Hologramm wird mit der DFT rekonstruiert. Dabei wird der Rekonstruktionsabstand z mindestens so groß gewählt, dass wie in Abbildung 3.4 (a) dargestellt „Image“, „Twin-Image“ und nullte Beugungsordnung voneinander getrennt und vollständig rekonstruiert werden. Durch Ausmessen der Abstände

Δd_x und Δd_y (Pixel) in der mit der DFT rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilung werden die linearen Rekonstruktionsparameter L_x und L_y bestimmt. Es gilt:

$$L_x = \frac{\Delta d_x}{N_x} \quad \text{und} \quad L_y = \frac{\Delta d_y}{N_y}. \quad (3.10)$$

Die quadratischen Koeffizienten K_x und K_y können aus der Größe (Pixel) des „Image“ ΔI_x und ΔI_y bestimmt werden. Hierfür wird zunächst Gleichung 2.88 in 2.84 eingesetzt und anschließend nach K_x^{-1} bzw. K_y^{-1} aufgelöst:

$$K_x^{-1} = \frac{2N_x}{\Delta I_x - N_x^2 \Delta x^2 / \lambda z} + \frac{\lambda^2}{\Delta x^2} \quad \text{bzw.} \quad K_y^{-1} = \frac{2N_y}{\Delta I_y - N_y^2 \Delta y^2 / \lambda z} + \frac{\lambda^2}{\Delta y^2}. \quad (3.11)$$

Für eine anschaulichere Darstellung sind die Gleichungen 3.11 nach K_x^{-1} bzw. K_y^{-1} aufgelöst. Für den Spezialfall $z \rightarrow \infty$ (Rekonstruktion im Unendlichen) gilt:

$$K_x^{-1} = \frac{2N_x^2}{\Delta I_x} + \frac{\lambda^2}{\Delta x^2} \approx \frac{2N_x^2}{\Delta I_x} \quad \text{bzw.} \quad K_y^{-1} = \frac{2N_y^2}{\Delta I_y} + \frac{\lambda^2}{\Delta y^2} \approx \frac{2N_y^2}{\Delta I_y}. \quad (3.12)$$

Dabei kann für $\lambda \ll \Delta x$ der zweite Summand vernachlässigt werden. Für die hier eingesetzte Wellenlänge von $\lambda = 532 \text{ nm}$ und einem Pixelabstand von $\Delta x \approx 5 \text{ } \mu\text{m}$ ist diese Näherung zulässig.

Die diskrete Fresneltransformation vereinfacht sich für $z \rightarrow \infty$ in eine diskrete Fouriertransformation (Kapitel 2.2.1). Um das Verfahren möglichst einfach zu halten werden im Folgenden die Rekonstruktionsparameter K_x und K_y aus der mit FFT rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilung bestimmt (Abbildung 3.4 (b)).

In der Praxis werden dafür die Größen Δd_x , Δd_y , ΔI_x und ΔI_y manuell (z. B. mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramms) oder automatisiert durch Schwellwertdetektion aus der rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilung (Abbildung 3.4) ermittelt. Anschließend erfolgt die Berechnung der Rekonstruktionsparameter durch Einsetzen in die Gleichungen 3.10 und 3.11 bzw. 3.12.

Die Genauigkeit der Rekonstruktionsparameter hängt davon ab, wie exakt Größe und Position des „Image“ bestimmt werden. Für die Fehler der Rekonstruktionsparameter ergibt sich nach Anwendung des Fehlerfortpflanzungsgesetzes auf die Gleichungen 3.10 und 3.12:

$$\sigma_{L_x} = \frac{1}{N_x} \sigma_{\Delta d_x} \quad \text{und} \quad \sigma_{L_y} = \frac{1}{N_y} \sigma_{\Delta d_y} \quad (3.13)$$

$$\sigma_{K_x} = \frac{1}{2N_x^2} \sigma_{\Delta I_x} \quad \text{und} \quad \sigma_{K_y} = \frac{1}{2N_y^2} \sigma_{\Delta I_y}. \quad (3.14)$$

Zur Abschätzung der Genauigkeit des Verfahrens wird der Fehler, mit dem Lage und Größe des „Image“ bestimmt werden, mit einem Pixel abgeschätzt. Bei einer Hologrammgröße von 1024×1024 Pixeln (typischer Wert) beträgt die Standardabweichung der Rekonstruktionsparameter: $\sigma_{L_{x,y}} \approx 1 \cdot 10^{-3}$ und $\sigma_{K_{x,y}} \approx 5 \cdot 10^{-7}$. Anwendung des Fehlerfortpflanzungsgesetzes auf das mathematische Modell 2.63 der rekonstruierten räumlichen Phasenverteilung $\varphi(x,y)$ ergibt:

$$\sigma_\varphi = 2\pi \sqrt{(k^2 \sigma_{K_x})^2 + (l^2 \sigma_{K_y})^2 + (k \sigma_{L_x})^2 + (l \sigma_{L_y})^2}. \quad (3.15)$$

Am Bildrand der rekonstruierten räumlichen Phasenverteilung ($k = N_x/2$, $l = N_y/2$) ist der Fehler maximal und beträgt mit den abgeschätzten Werten für $\sigma_{L_{x,y}}$ und $\sigma_{K_{x,y}}$ (s. o.): $\sigma_\varphi \approx 1,5\pi$. Demnach ist die Genauigkeit, mit der die Rekonstruktionsparameter mit der hier beschriebenen Methode bestimmt werden können, nicht ausreichend. Weiterhin ist davon auszugehen, dass in der experimentellen Praxis der hier mit einem Pixel optimistisch abgeschätzte Fehler für die Position und Größe des „Image“ deutlich größer sein kann. Aus diesem Grund ist die weitere Optimierung der Rekonstruktionsparameter erforderlich. Ein dazu im Rahmen dieser Arbeit entwickeltes Verfahren wird in Kapitel 3.5.2 vorgestellt.

3.5.2 Optimierung der Rekonstruktionsparameter

Die räumliche Phasenverteilung in der Hologrammebene kann mathematisch durch ein zweidimensionales Polynom zweiten Grades (Gleichung 2.63) beschrieben werden. Die Koeffizienten (L_x , L_y , K_x , K_y) des Polynoms sind die gesuchten Rekonstruktionsparameter. In welchem Bereich ein Parametersatz (L'_x , L'_y , K'_x , K'_y), der z. B. mit dem in Kapitel 3.5.1 beschriebenen Verfahren bestimmt wurde, von den gesuchten Rekonstruktionsparametern abweicht, wird durch Einsetzen in Gleichung 2.63 und Ausführen der NDRM überprüft. Die derart rekonstruierte räumliche Phasenverteilung ist durch die Differenz aus der tatsächlichen räumlichen Phasenverteilung $\varphi(k,l)$ in der Hologrammebene und der durch Einsetzen des Parametersatzes (L'_x , L'_y , K'_x , K'_y) in Gleichung 2.63 beschriebenen räumlichen Phasenverteilung $\varphi(k,l)'$ gegeben:

$$\begin{aligned} \Delta\varphi(k,l) &= \varphi(k,l) - \varphi(k,l)' \\ &= 2\pi [(K_x - K'_x)k^2 + (K_y - K'_y)l^2 \\ &\quad + (L_x - L'_x)k + (L_y - L'_y)l] + c_0. \end{aligned} \quad (3.16)$$

Für den Fall optimal angepasster Rekonstruktionsparameter (konstante räumliche Phasenverteilung) verschwinden die Koeffizienten in Gleichung 3.16 und es gilt: $\Delta\varphi(k,l) = c_0$.

Qualitativ kann die Güte des Parametersatzes durch Betrachten der rekonstruierten räumlichen Phasenverteilung beurteilt werden. Optimal angepasste Parameter erzeugen eine konstante räumliche Phasenverteilung (Abbildung 3.5 (b)), während schon geringe Abweichungen der Parameter ein Sägezahnstreifenmuster generieren (Abbildung 3.5 (a)). Eine Möglichkeit die Rekonstruktionsparameter anzupassen besteht darin, die Parameter empirisch zu variieren und anschließend die NDRM auszuführen, bis sich eine möglichst konstante räumliche Phasenverteilung ergibt. Da das empirische Optimieren der Rekonstruktionsparameter zeit-aufwendig ist und keine reproduzierbaren Ergebnisse liefert, wird ein automatisiertes Verfahren entwickelt.

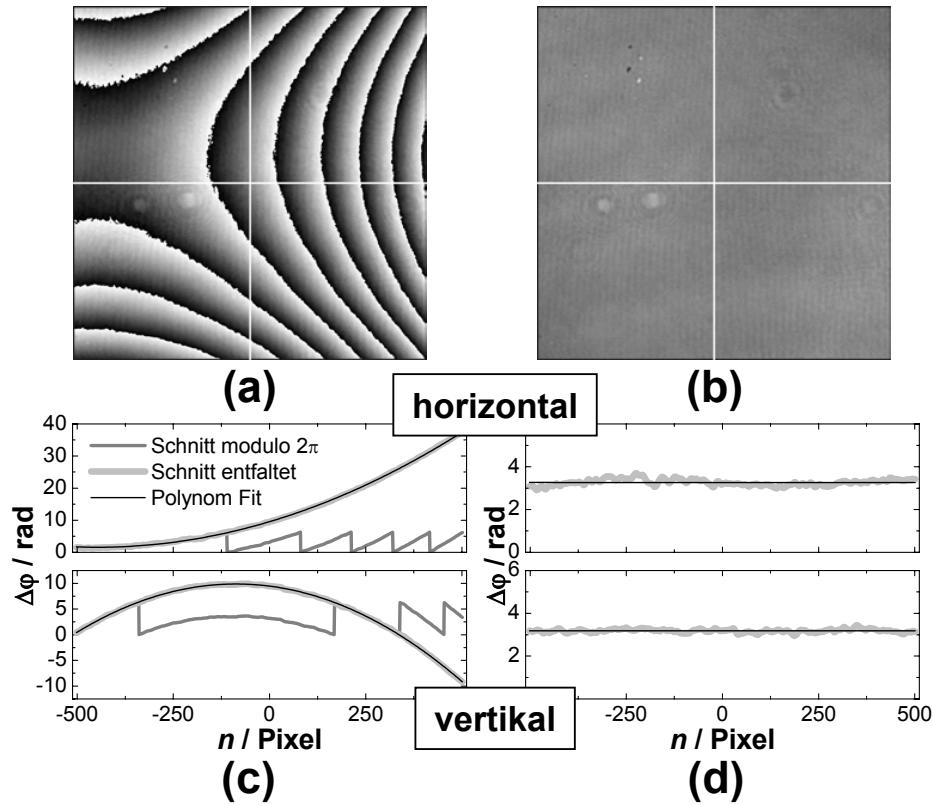


Abbildung 3.5: Mit NDRM rekonstruierte räumliche Phasenverteilung mod 2π : (a) mit falschen Rekonstruktionsparametern (Fehler $\leq 10\%$), (b) mit optimierten Parametern, (c),(d) horizontale Schnitte (oben) und vertikale Schnitte (unten) entlang der weißen Linien in (a) u. (b).

Die mit dem Parametersatz (L'_x, L'_y, K'_x, K'_y) rekonstruierte räumliche Differenzphasenverteilung $\Delta\phi(k, l)$ wird durch Gleichung 3.16 beschrieben. Die Koeffizienten des Polynoms können numerisch durch Anpassen eines zweidimensionalen

Polynoms zweiten Grades an $\Delta\varphi(k, l)$ bestimmt werden:

$$P(k, l) = p_{x2}k^2 + p_{y2}l^2 + p_{x1}k + p_{y1}l + p_0. \quad (3.17)$$

Gleichsetzen der Polynome 3.16 und 3.17 und Koeffizientenvergleich ergibt für die gesuchten Parameter:

$$\begin{aligned} L_x &= \frac{1}{2\pi} p_{x1} + L'_x \\ L_y &= \frac{1}{2\pi} p_{y1} + L'_y \\ K_x &= \frac{1}{2\pi} p_{x2} + K'_x \\ K_y &= \frac{1}{2\pi} p_{y2} + K'_y. \end{aligned} \quad (3.18)$$

Da die k -Terme und l -Terme in Gleichung 3.17 linear unabhängig sind, können die Koeffizienten alternativ durch Anpassen zweier eindimensionaler Polynome zweiten Grades an einen horizontalen Schnitt (Gleichung 3.19, $l = \text{konst.}$) und einen vertikalen Schnitt (Gleichung 3.20, $k = \text{konst.}$) durch die räumliche Differenzphasenverteilung $\Delta\varphi(k, l)$ bestimmt werden. Dadurch wird das numerische Anpassen der Koeffizienten vereinfacht und Rechenzeit eingespart.

$$P(k) = p_{x2}k^2 + p_{x1}k + p_{x0} \quad (3.19)$$

$$P(l) = p_{y2}l^2 + p_{y1}l + p_{y0} \quad (3.20)$$

Da die eindimensionalen Schnitte durch die Differenzphasenverteilung $\Delta\varphi(k, l) \bmod 2\pi$ vorliegen, müssen zuvor die 2π -Phasensprünge, z. B. mit der in Kapitel 3.4 beschriebenen Methode zum Entfalten, beseitigt werden. Zur Minimierung von Entfaltungsfehlern werden die Schnitte zuvor mit der in Kapitel 3.3 beschriebenen Methode Tiefpass gefiltert. Der Einfluss der Glättung auf die angepassten Rekonstruktionsparameter (Glättungsradius R_{GL} und Anzahl der Glättungen N_{GL}) wird in Kapitel 4.2.2 quantitativ untersucht.

Abbildung 3.5 zeigt zur Illustration der Wirkungsweise des Anpassungsverfahrens die mit der NDRM rekonstruierten räumlichen Phasenverteilungen: (a) Nach Bestimmung der Parameter mit den Gleichungen 3.10 und 3.12 aus der mit FFT (DFT, $z \rightarrow \infty$) rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilung des aufgenommenen Hologramms und (b) nach Bestimmung der Parameter aus den Koeffizienten des angepassten Polynoms (Gleichung 3.18). Die in Abbildung 3.5 (c) und (d) aufgetragenen Schnitte durch die räumlichen Phasenverteilungen in Abbildung 3.5 (a) und (b) quantifizieren den Unterschied zwischen genäherten und optimal angepassten Rekonstruktionsparametern.

Weichen die Näherungswerte der Rekonstruktionsparameter (L'_x, L'_y, K'_x, K'_y) so stark von den gesuchten Rekonstruktionsparametern (L_x, L_y, K_x, K_y) ab, dass

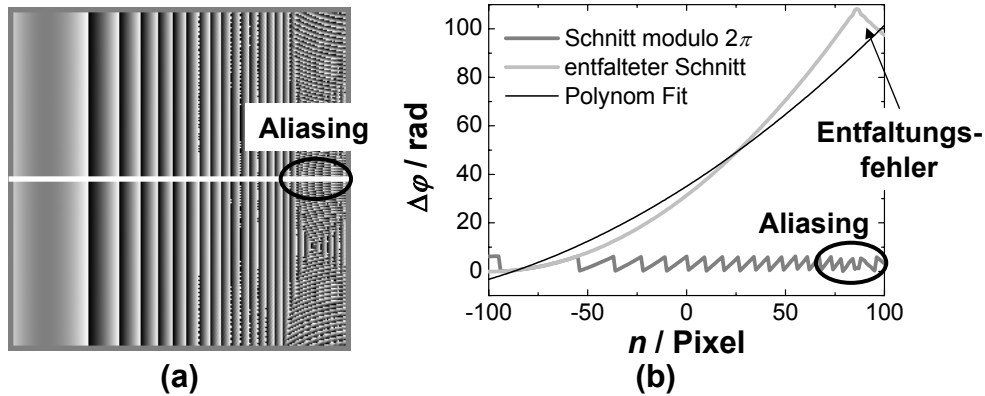


Abbildung 3.6: (a) Mit NDRM rekonstruierte räumliche Phasenverteilung mod 2π bei abweichenden Rekonstruktionsparametern L_x und K_x , (b) horizontaler Schnitt entlang der weißen Linie in (a), entfalteter Schnitt und angepasstes Polynom zweiten Grades.

die mit NDRM rekonstruierte räumliche Phasenverteilung (Sägezahnstreifen mod 2π) Frequenzen größer als die Nyquist-Frequenz enthält (Abbildung 3.6 (a), rechter Bildrand), tritt beim Entfalten eines Schnittes durch die räumliche Phasenverteilung Aliasing auf. Das verursacht Fehler beim numerischen Anpassen des Polynoms (Abbildung 3.6 (b)) und führt dadurch zu falschen Rekonstruktionsparametern. Daher ist es notwendig bereits in einem ersten Schritt, z. B. mit dem in Kapitel 3.5.1 beschriebenen Verfahren, möglichst präzise Näherungswerte für die Rekonstruktionsparameter zu bestimmen.

Abbildung 3.7 zeigt abschließend eine Übersicht (Flussdiagramm) zur Bestimmung der Rekonstruktionsparameter. Quantitative Untersuchungen zur Genauigkeit des Optimierungsverfahrens werden in Kapitel 4.2.2 beschrieben.

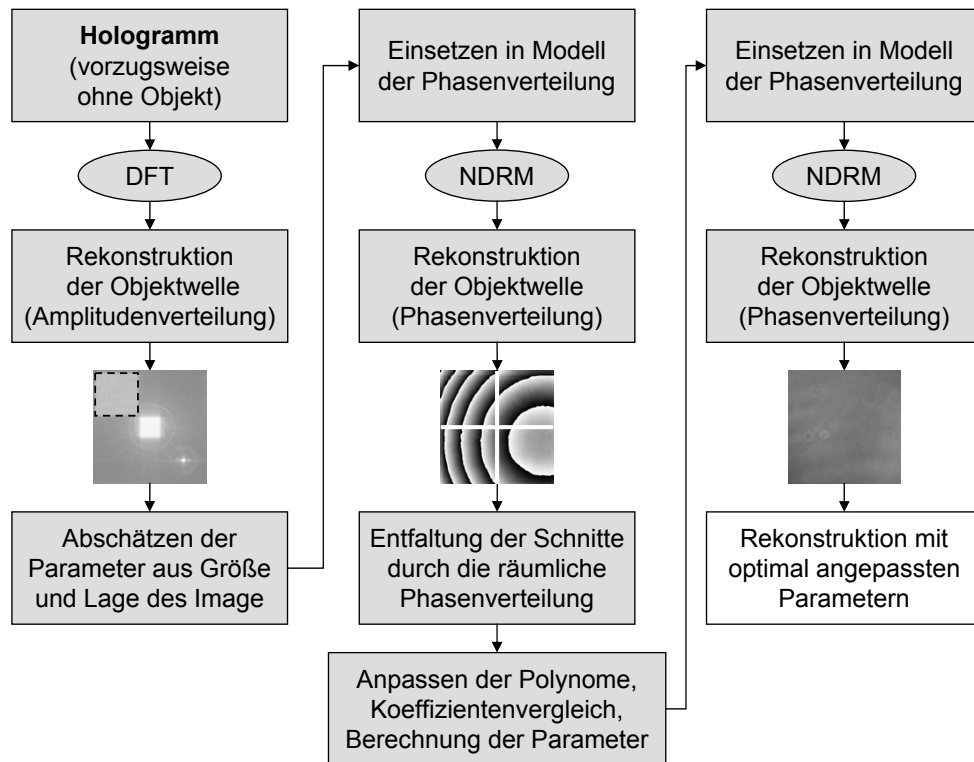


Abbildung 3.7: Schematische Übersicht der Vorgehensweise beim Anpassen der Rekonstruktionsparameter für die NDRM.

4 Ergebnisse und Diskussion

Zuerst werden in diesem Abschnitt die in Kapitel 2 beschriebenen numerischen Methoden zur Rekonstruktion digitaler „off-axis“ Hologramme im Experiment verglichen. Anhand der Ergebnisse wird der für die digitalholographische Mikroskopie am besten geeignete Algorithmus für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Es folgt die Überprüfung der Genauigkeit, mit der die für die Rekonstruktion der komplexen Objektwelle in der Hologrammebene erforderlichen Rekonstruktionsparameter angepasst werden können. Anschließend wird das System charakterisiert und im Hinblick auf die Anwendung in der Mikroskopie optimiert. Es werden Ergebnisse von Messungen an technischen Objekten zur Systemcharakterisierung und an biologischen Proben vorgestellt. Abschließend erfolgt die Beschreibung der im Rahmen der Projektarbeit entwickelten Demonstratoren.

4.1 Vergleich der Rekonstruktionsmethoden

4.1.1 Direkte Rekonstruktion mit DFT und CVM

Die am häufigsten publizierten Rekonstruktionsmethoden sind die in Kapitel 2.2.1 und 2.2.2 beschriebene diskrete Fresneltransformation (DFT) und die Faltungsmethode (CVM), insbesondere, da sie einfach zu implementieren sind. Um die Methoden miteinander zu vergleichen werden mit einem Aufbau gemäß Abbildung 3.1 in Durchlichtanordnung und „off-axis“ Geometrie mit einem 40x Mikroskopobjektiv ($NA = 0,6$) zur Vergrößerung der Objektwelle Hologramme eines negativ USAF 1951 Test-Charts (Gruppe 8 u. 9) aufgezeichnet. Dabei wird der Objektebenenabstand unter Einsatz einer Differentialmikrometerschraube (Positioniergenauigkeit $\pm 1 \mu\text{m}$) variiert: $\Delta g = 40 \mu\text{m}$, $60 \mu\text{m}$ und $80 \mu\text{m}$. Anschließend werden die aufgezeichneten Hologramme mit der DFT und der CVM rekonstruiert. Hierbei wird jeweils nur ein quadratischer Ausschnitt der Größe 960×960 Pixel der mit der CCD-Kamera (Sony XCD-SX900) aufgezeichneten Hologramme ausgewertet.

Bei der Rekonstruktion mit DFT wird die durch Gleichung 2.27 beschriebene Koordinatentransformation durchgeführt, so dass auch das durch die „off-axis“

Geometrie von der nullten Beugungsordnung räumlich getrennte „Image“ und das „Twin-Image“ rekonstruiert werden. Im Gegensatz dazu ist das Sampling-Intervall bei der CVM konstant (Gleichung 2.39). Deshalb wird hier die Anzahl der diskreten Werte der „off-axis“ Hologramme durch das Anfügen von Nullen (Gleichung 2.40) auf 4096×4096 Pixel vergrößert.

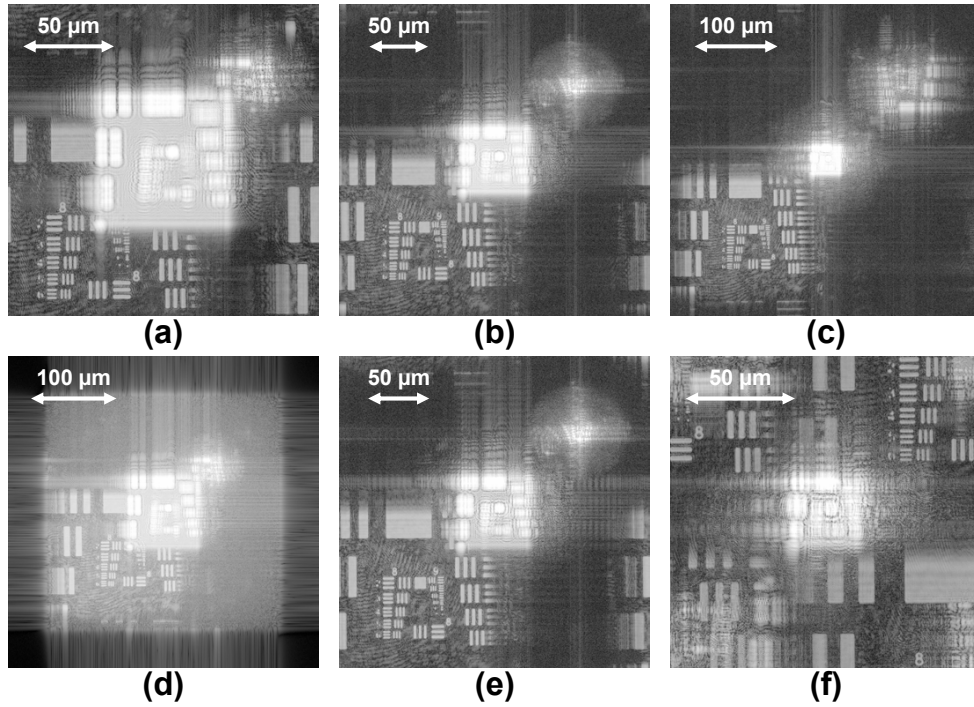


Abbildung 4.1: Rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung (logarithmische Darstellung) des negativ USAF 1951 Test-Charts, (a)-(c) Rekonstruktion mit DFT, (d)-(f) Rekonstruktion mit CVM, (links) $\Delta g = 40 \mu\text{m}$, $z = 0,089 \text{ m}$, (Mitte) $\Delta g = 60 \mu\text{m}$, $z = 0,176 \text{ m}$, (rechts) $\Delta g = 80 \mu\text{m}$, $z = 0,400 \text{ m}$.

In Abbildung 4.1 (a) bis (c) sind die mit DFT rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilungen dargestellt. Abbildung 4.1 (d) bis (f) zeigt zum Vergleich die mit CVM rekonstruierten Amplitudenverteilungen. Bei beiden Rekonstruktionsmethoden werden sowohl die nullte Beugungsordnung als auch das „Twin-Image“ rekonstruiert. Da die Intensität der nullten Beugungsordnung größer als die des „Image“ und des „Twin-Image“ ist, wird der Kontrast durch eine logarithmische Darstellung verbessert. Bei den in Abbildung 4.1 (a) und (d) dargestellten Amplitudenverteilungen wird ein großer Teil des „Image“ durch die nullte Beugungsordnung überlagert. In Abbildung 4.1 (f) wird das rekonstruierte Wellenfeld durch Aliasing-Effekte stark gestört.

Das Verhältnis der Breite der nullten Beugungsordnung zur Breite des gesamten

rekonstruierten Wellenfeldes ergibt sich aus Gleichung 2.81:

$$V_{\text{NBO}} = \frac{N_x \Delta x^2}{\lambda |z|}. \quad (4.1)$$

Ein rekonstruiertes holographisches Bild kann für $V_{\text{NBO}} \leq 1/4$ ausgewertet werden. Dieser empirisch festgelegte Grenzwert $V_{\text{NBO}} = 1/4$ entspricht ungefähr der Größe der nullten Beugungsordnung in Abbildung 4.1 (b) und (e). Für den Rekonstruktionsabstand folgt:

$$|z| \geq \frac{4N_x \Delta x^2}{\lambda} \quad \text{für } V_{\text{NBO}} \leq 1/4. \quad (4.2)$$

Der Mindestrekonstruktionsabstand der vorliegenden Messung, der bei den in Abbildung 4.1 (b), (c), (e) und (f) dargestellten Ergebnissen eingehalten wird, beträgt $z_{\text{min}} = 0,156$ m. Der „kritische“ Rekonstruktionsabstand z_k für das Auftreten von Aliasing-Effekten ist durch die Beziehungen 2.31 und 2.38 gegeben. Bei der DFT wird das Abtasttheorem für $z < z_k$ und bei der CVM für $z > z_k$ verletzt. Der kritische Rekonstruktionsabstand beträgt in diesem Experiment rechnerisch für die DFT ($N_x = 960$, $\Delta x = 4,65 \mu\text{m}$, $\lambda = 532 \text{ nm}$): $z_k = 0,039$ m und durch die Vergrößerung der Hologramme (s. o.) bei der CVM: $z_k = 0,166$ m. Die in Abbildung 4.1 dargestellten Ergebnisse zeigen diesbezüglich Übereinstimmung mit der Theorie.

Die für die numerische Rekonstruktion benötigte Rechenzeit beträgt bei der DFT 0,8 s. Das entspricht ungefähr der Rechenzeit für eine diskrete Fouriertransformation. Da bei der CVM zwei Fouriertransformationen ausgeführt werden, verdoppelt sich die Rechenzeit. Die Vergrößerung des digitalen Hologramms bei der CVM (s. o.) führt zu einer weiteren Erhöhung der Rechenzeit um den Faktor ≈ 25 auf 40 s. Diese Angaben beziehen sich auf einen PC mit Intel Pentium 4 Prozessor, 2,8 GHz und 2 GB Ram.

4.1.2 Rekonstruktion in der Hologrammebene mit NDRM und eFTM

Im Gegensatz zur DFT und CVM wird mit den in Kapitel 2.4.3 (NDRM) und 2.4.4 (eFTM) beschriebenen Methoden die komplexe Objektwelle in der Hologrammebene rekonstruiert. Die Methoden unterscheiden sich dadurch voneinander, dass bei der NDRM die Rekonstruktion im Ortsraum und bei der eFTM im Frequenzraum erfolgt.

Mit einem Aufbau gemäß Abbildung 3.1 werden in Durchlichtanordnung und „off-axis“ Geometrie Hologramme von zwei verschiedenen USAF 1951 Test-Charts aufgezeichnet. Dabei werden die Objektstrukturen scharf in die Hologrammebene abgebildet. Zur Vergrößerung der Objektwelle wird ein 20x Mikroskopobjektiv ($NA = 0,4$) eingesetzt. Die Aufzeichnung des transparenten USAF 1951 Test-Charts erfolgt mit einer Anordnung ohne Tubuslinse, während für die Aufnahme des negativen USAF 1951 Test-Charts eine Tubuslinse zwischen Mikroskopobjektiv und CCD-Sensor platziert wird. Außer den Hologrammen werden auch Bilder der Objekte mit ausgeblendeter Referenzwelle (Durchleuchtung mit Laserlicht) aufgezeichnet, die im Folgenden als „Referenzbilder“ bezeichnet werden.

Abbildung 4.2 zeigt zum Vergleich die Referenzbilder und die mit der NDRM und mit der eFTM rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilungen der aufgezeichneten Hologramme. Außerdem sind die Raumfrequenzspektren der Hologramme dargestellt. Der Einfluss der Tubuslinse wird durch den Vergleich der in Abbildung 4.2 (d) und (h) dargestellten Raumfrequenzspektren der digitalen Hologramme deutlich. Die Tubuslinse kollimiert die durch die Vergrößerung mit dem Mikroskopobjektiv divergente Objektwelle, so dass die räumliche Frequenzverteilung des Trägerstreifenmusters auf dem CCD-Sensor annähernd konstant ist.

Zwischen den mit der NDRM und der eFTM rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilungen des transparenten USAF 1951 Test-Charts (Abbildung 4.2 (b) und (c)) und des USAF 1951 negativ Test Charts (Abbildung 4.2 (f) und (g)) ist kein Unterschied erkennbar. Bestätigt wird der visuelle Eindruck durch den Vergleich der Korrelationskoeffizienten r_k zwischen der jeweiligen rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilung $E(k, l)$ und dem Referenzbild des Objekts $I_R(k, l)$:

$$r_k = \frac{\sum_{k,l} \left(E(k, l) - \overline{E(k, l)} \right) \left(I_R(k, l) - \overline{I_R(k, l)} \right)}{\sqrt{\sum_{k,l} \left(E(k, l) - \overline{E(k, l)} \right)^2 \sum_{k,l} \left(I_R(k, l) - \overline{I_R(k, l)} \right)^2}}. \quad (4.3)$$

Um die Rekonstruktionsmethoden repräsentativ miteinander vergleichen zu können werden zuerst die freien Parameter M (NDRM) bzw. v_0 und n (eFTM) optimiert. Der Parameter M gibt die Anzahl der Pixel der quadratischen ROI an, auf der die Objektwelle bei der Rekonstruktion mit der NDRM als konstant angenommen wird. Die Grenzfrequenz und die Ordnung des Butterworth-Filters zum Ausschneiden des „Image“ aus dem Raumfrequenzspektrum des digitalen Hologramms bei der eFTM werden durch die Parameter v_0 und n angegeben. Die Optimierung erfolgt durch empirisches Variieren der Parameter und die anschließende

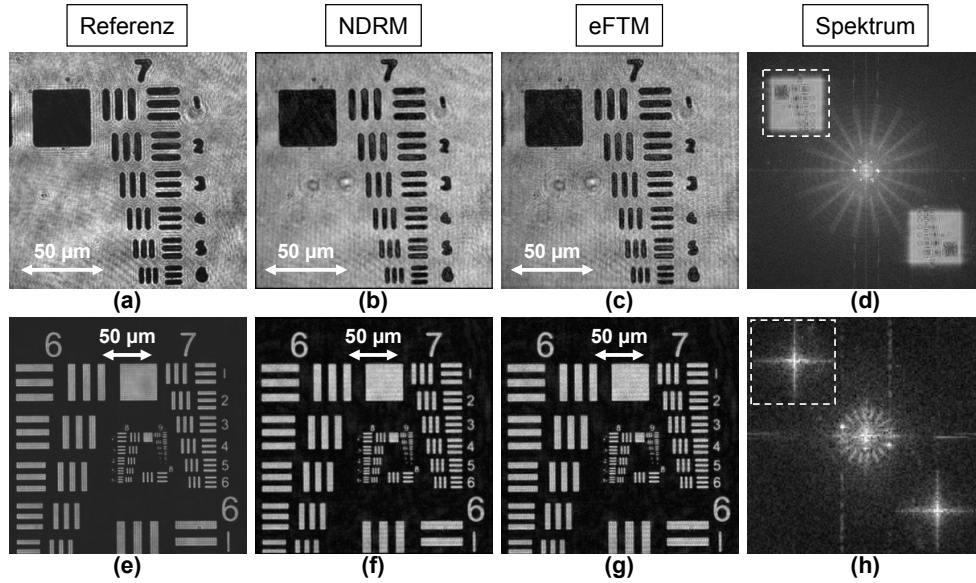


Abbildung 4.2: Rekonstruktion in der Hologrammebene mit NDRM und eFTM. (obere Reihe) Gruppe 7 des transparenten USAF 1951 Test-Charts, (untere Reihe) Gruppe 6 bis 9 des negativ USAF1951 Test-Charts, (a),(e) Referenzbild (Durchleuchtung mit Laserlicht), (b),(f) mit NDRM rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung, (c),(g) mit eFTM rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung, (d),(h) Raumfrequenzspektrum des Hologramms (markierter Bereich für die spektrale Filterung bei der eFTM ausgeschnitten).

Berechnung des Korrelationskoeffizienten mit Gleichung 4.3. Die Ergebnisse mit optimierten Parametern sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Methode	Bild 1	Bild 2	r_k / o. E.	Parameter
NDRM	Abb. 4.2 (a)	Abb. 4.2 (b)	0,88	$M = 25$
eFTM	Abb. 4.2 (a)	Abb. 4.2 (c)	0,87	$v_0 \approx \frac{1}{15} \text{ Px}^{-1}, n = 2$
NDRM	Abb. 4.2 (e)	Abb. 4.2 (f)	0,95	$M = 49$
eFTM	Abb. 4.2 (e)	Abb. 4.2 (g)	0,95	$v_0 \approx \frac{1}{80} \text{ Px}^{-1}, n = 2$

Tabelle 4.1: Korrelationskoeffizient zwischen dem Bild des Objekts mit ausgeblendeter Referenzwelle und der mit NDRM bzw. eFTM in der Hologrammebene rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilung des Objekts ($\text{Px}^{-1} = \text{pro Pixel}$).

Der Vergleich der Korrelationskoeffizienten in Tabelle 4.1 zeigt, dass die NDRM und die eFTM bei der Rekonstruktion der komplexen Objektwelle in der Hologrammebene ähnliche Ergebnisse liefern. Die Korrelationskoeffizienten des transparenten USAF 1951 Test-Charts sind deutlich niedriger als die des negativ Test-Charts. Grund dafür ist der geringere Anteil an transparenter Glasfläche

des negativ Test-Charts. In den vollständig transparenten Bereichen sind deutlich mehr Störungen erkennbar. Ursache hierfür sind Beugungsringe und Vielfachreflexionen, die an den realen optischen Komponenten des experimentellen Aufbaus, z. B. einem Strahlteilerwürfel mit nicht vollständig planarer Grenzfläche, entstehen können.

Abschließend werden Raumfrequenzspektren der mit der NDRM und der eFTM rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilungen und der Referenzbilder für beide USAF 1951 Test-Charts berechnet. Für eine anschauliche eindimensionale Darstellung werden die Raumfrequenzspektren entlang konzentrischer Kreise um den Ursprung der Spektren aufsummiert und normiert (Abbildung 4.3). Hierbei entspricht die normierte Raumfrequenz $\nu = 1,0$ der Nyquist-Frequenz des zur Aufzeichnung eingesetzten CCD-Sensors.

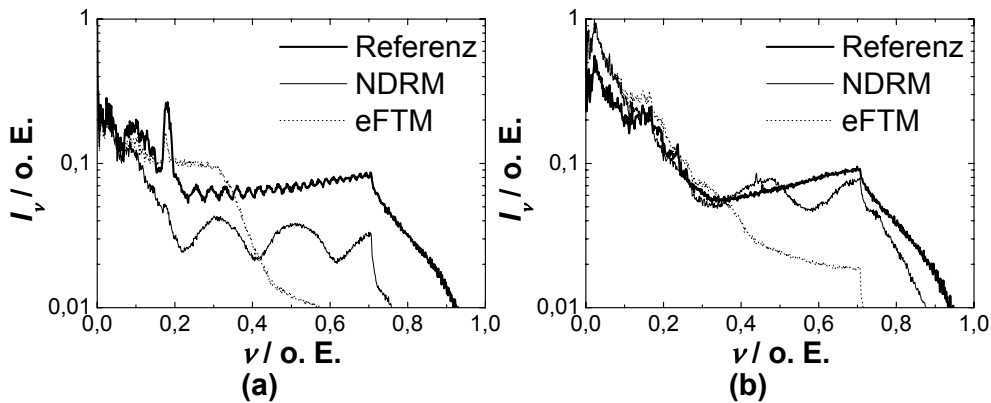


Abbildung 4.3: Normierte Raumfrequenzspektren in logarithmischer Darstellung der mit der NDRM und der eFTM rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilungen und des Referenzbildes (a) des transparenten USAF 1951 Test-Charts, (b) des negativ USAF 1951 Test-Charts.

Der Vergleich der in Abbildung 4.3 dargestellten Raumfrequenzspektren der rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilungen zeigt im unteren Spektralbereich sehr gute Übereinstimmung mit dem jeweiligen Referenzbild. Aufgrund der Störungen (s. o.) ist die Übereinstimmung im Fall des USAF 1951 negativ Test-Charts deutlich besser. Die in Abbildung 4.3 (b) aufgetragenen Kurven sind im unteren Drittel des Spektralbereiches nahezu identisch. Zu hohen Raumfrequenzen fallen die Kurven beider Rekonstruktionsmethoden im Vergleich zur Referenz stärker ab, was einer Tiefpassfilterung entspricht.

Die für die numerische Rekonstruktion benötigte Rechenzeit beträgt bei der NDRM 0,6 s und bei der eFTM 1,8 s (PC mit Intel Pentium 4 Prozessor, 2,8 GHz und 2 GB Ram).

4.1.3 Propagation der komplexen Objektwelle mit DFT und CVM

In diesem Abschnitt werden Untersuchungen zur weiteren Propagation der mit der NDRM in der Hologrammebene rekonstruierten komplexen Objektwelle mit der DFT und der CVM durchgeführt. Hierfür werden mit einem Aufbau gemäß Abbildung 3.1 in Durchlichtanordnung und „off-axis“ Geometrie Hologramme des USAF 1951 negativ Test-Charts aufgezeichnet. Dabei wird der Objektebenenabstand Δg in $10 \mu\text{m}$ Schritten im Bereich zwischen $0 \mu\text{m}$ und $100 \mu\text{m}$ variiert. Zur Vergrößerung der Objektwelle wird ein $40\times$ Mikroskopobjektiv ($\text{NA} = 0,6$) eingesetzt. Die Auswertung der aufgezeichneten Hologramme erfolgt in zwei Schritten. Zuerst wird die komplexe Objektwelle $\Psi_0(k, l)$ mit der NDRM in der Hologrammebene rekonstruiert und anschließend zum Vergleich mit der DFT und der CVM in die Bildebene propagiert. Da die NDRM und die eFTM bei der Rekonstruktion in der Hologrammebene nahezu gleichwertige Ergebnisse liefern, die NDRM aber nur $\frac{1}{3}$ der Rechenzeit der eFTM benötigt, wird hier auf die Rekonstruktion mit der eFTM in der Hologrammebene verzichtet (Kapitel 4.1.2).

Exemplarisch sind in Abbildung 4.4 die mit der NDRM + DFT und mit der NDRM + CVM rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilungen des im Objektebenenabstand $\Delta g = 10 \mu\text{m}$, $20 \mu\text{m}$ und $90 \mu\text{m}$ positionierten Test-Charts dargestellt. Die Rekonstruktion erfolgt durch die Kombination der diffraktiven Verfahren mit einer Methode zur Rekonstruktion in der Hologrammebene ohne nullte Beugungsordnung und „Twin-Image“.

In den Abbildungen 4.4 (a), (b) und (f) wird die rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung von Aliasing-Effekten überlagert, die besonders stark am Bildrand auftreten. Bei der CVM kann Aliasing durch das Anfügen von Nullen an das digitale Hologramm (Gleichung 2.40) unterdrückt werden. Auflösen von Ungleichung 2.38 nach N_x ergibt die Mindestbreite (Pixel) des digitalen Hologramms, bei der kein Aliasing auftritt (N_y analog):

$$N_x \geq \frac{|z|\lambda}{\Delta x^2}. \quad (4.4)$$

Aus Gleichung 4.4 folgt, dass das mit dem Objektebenenabstand $\Delta g = 50 \mu\text{m}$ aufgezeichnete Hologramm ($z = 0,066 \text{ m}$, $\lambda = 532 \text{ nm}$, $\Delta x = 4,65 \mu\text{m}$) auf mindestens 1624×1624 diskrete Werte erweitert werden muss. Für die Beschleunigung der schnellen Fouriertransformation bei der CVM wird das Hologramm auf 2048×2048 diskrete Werte (Potenz von zwei) vergrößert. Entsprechend wird das im Objektebenenabstand $\Delta g = 100 \mu\text{m}$ ($z = 0,132 \mu\text{m}$) aufgezeichnete Hologramm auf 4096×4096 diskrete Werte erweitert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.5 (b) und (c) dargestellt. Abbildung 4.5 (a) zeigt als Referenz die mit der

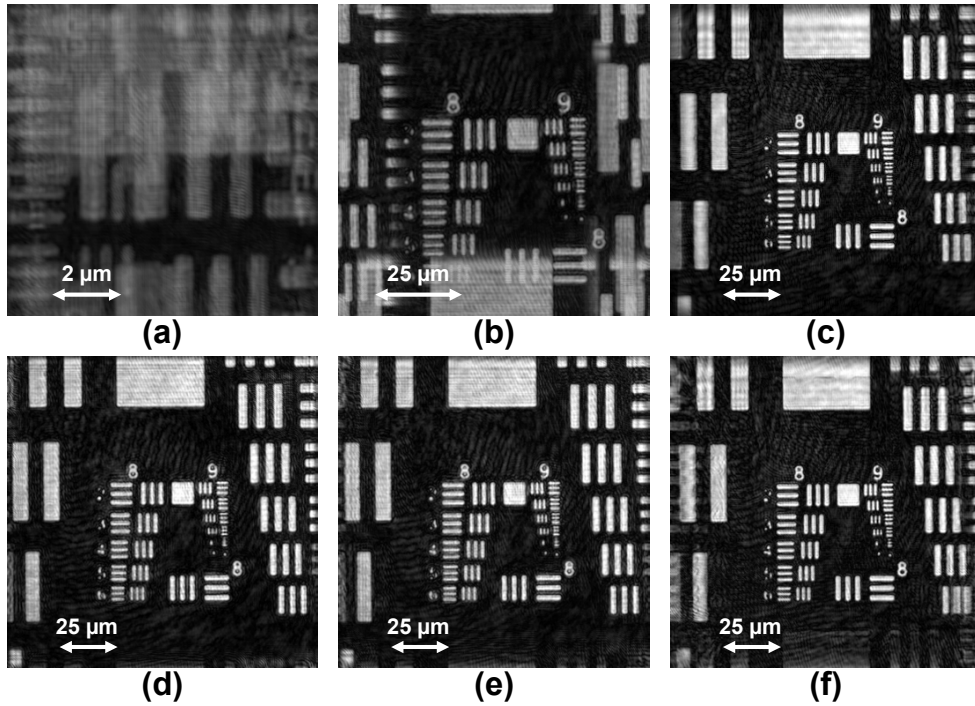


Abbildung 4.4: Rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung des negativ USAF 1951 Test-Charts: (links) $\Delta g = 10 \mu\text{m}$, $z = 0,013 \text{ m}$, (Mitte) $\Delta g = 20 \mu\text{m}$, $z = 0,028 \text{ m}$, (rechts) $\Delta g = 90 \mu\text{m}$, $z = 0,119 \text{ m}$; (a)-(c) Propagation der mit der NDRM in der Hologrammebene rekonstruierten komplexen Objektwellen mit der DFT, (d)-(f) Propagation mit der CVM.

NDRM rekonstruierte Amplitudenverteilung des scharf in die Hologrammebene abgebildeten Test-Charts ($\Delta g = 0$, $z = 0$). Der Vergleich von Abbildung 4.4 (f) mit Abbildung 4.5 (b) und (c) zeigt, dass Aliasing-Effekte durch das Anfügen von Nullen vollständig unterdrückt werden können. Beim Betrachten der Abbildungen ist besonders auf den Rand der rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilungen zu achten.

Die in Kapitel 2.2.1 und 2.2.2 beschriebene Theorie besagt, dass unterhalb eines kritischen Rekonstruktionsabstandes z_k bei der DFT Aliasing auftritt (Ungleichung 2.31). Im Gegensatz dazu tritt bei der CVM Aliasing für $|z| > z_k$ auf (Ungleichung 2.38). Der kritische Rekonstruktionsabstand beträgt bei dieser Messung ($N_x = 960$, $\Delta x = 4,65 \mu\text{m}$, $\lambda = 532 \text{ nm}$) $z_k = 0,039 \text{ m}$. Der Vergleich der Abbildungen 4.4 (a) und (b) mit Abbildung 4.4 (f) zeigt, dass bei der Rekonstruktion mit DFT die Aliasing-Effekte für $|z| < z_k$ viel stärker als bei der Rekonstruktion mit CVM für $|z| > z_k$ auftreten, obwohl in (f) $z \approx 3z_k$ beträgt. Die Ursache dafür besteht darin, dass bei der DFT der Rekonstruktionsabstand z im Nenner des

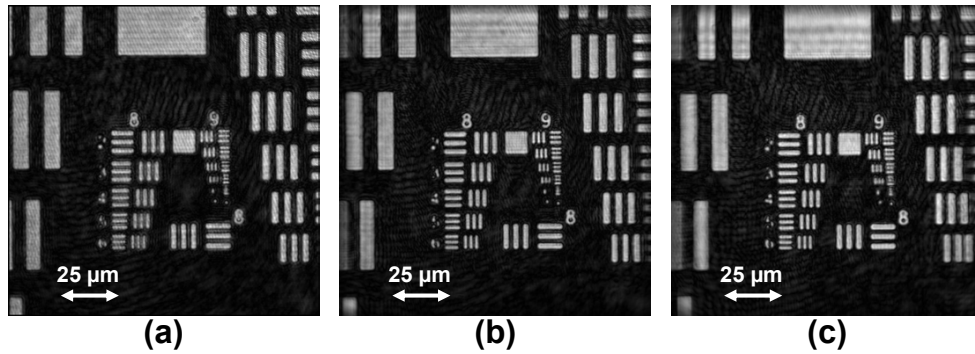


Abbildung 4.5: (a)-(c) Rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung des negativ USAF 1951 Test-Charts: (a) mit NDRM, $\Delta g = 0 \mu\text{m}$, $z = 0$, $N_x = N_y = 960$, (b) mit NDRM+CVM, $\Delta g = 50 \mu\text{m}$, $z = 0,066 \text{ m}$, $N_x = N_y = 2048$, (c) mit NDRM+CVM, $\Delta g = 100 \mu\text{m}$, $z = 0,132 \text{ m}$, $N_x = N_y = 4096$.

Argumentes des Exponentialfaktors steht, der für $|z| < z_k$ das Sampling-Theorem verletzt (Gleichung 2.26). Bei der CVM steht z im Zähler des Argumentes des Exponentialfaktors (Gleichung 2.37). Dadurch wächst bei der DFT der Exponentialfaktor mit abnehmendem z stärker als bei der CVM bei zunehmendem z . Im Gegensatz zur DFT besteht bei der CVM außerdem die Möglichkeit Aliasing-Effekte durch Vergrößerung der Anzahl der diskreten Werte des digitalen Hologramms entsprechend Gleichung 2.40 vollständig zu unterdrücken (Abbildung 4.5 (b) und (c)).

Durch die Rekonstruktion in der Hologrammebene (hier mit NDRM) werden die quadratischen Phasenterme der Objektwelle entfernt, so dass diese numerisch kollimiert wird. Bei der Propagation mit DFT wird die durch Gleichung 2.27 beschriebene Koordinatentransformation durchgeführt. Dabei verringert sich die Pixelauflösung der rekonstruierten Objektwelle mit zunehmendem Rekonstruktionsabstand z . Im Gegensatz dazu ist bei der CVM das Sampling-Intervall konstant (Gleichung 2.39). Das hat gegenüber der DFT zum einen den Vorteil, dass die Pixelauflösung nicht reduziert wird und zum anderen, dass der Abbildungsmaßstab bei der Propagation konstant bleibt (Vergleich der Abbildungen 4.4 (a) bis (c) mit (d) bis (f)).

Die Rechenzeit für die Propagation der komplexen Objektwelle mit der DFT beträgt 0,8 s und mit der CVM 1,5 s. Insgesamt ergibt sich die Dauer der Rekonstruktion aus der Summe der für die Rekonstruktion in der Hologrammebene und der für die anschließend durchgeführte Propagation benötigten Rechenzeit: NDRM+DFT $\Delta t = 1,4 \text{ s}$, NDRM+CVM $\Delta t = 2,1 \text{ s}$. Die Vergrößerung des digitalen Hologramms zur Unterdrückung von Aliasing-Effekten bei der Propagation mit der CVM führt zu einer Erhöhung der Rechenzeit um den Faktor ≈ 5 bei

2048 × 2048 Pixeln bzw. ≈ 25 bei 4096 × 4096 Pixeln (PC mit Intel Pentium 4 Prozessor, 2,8 GHz und 2 GB Ram).

4.1.4 Abbildungsfehler bei der Propagation

Da bei der Propagation mit der CVM das Sampling-Intervall konstant bleibt (Gleichung 2.39) wird erwartet, dass der Abbildungsmaßstab bei der Propagation ebenfalls konstant bleibt. Diese Annahme wird zunächst durch den in Kapitel 4.1.3 durchgeführten qualitativen Vergleich zwischen der DFT und der CVM bestätigt.

Für eine genauere quantitative Analyse werden die in Abbildung 4.5 (a) bis (c) dargestellten Amplitudenverteilungen in 5×5 gleich große Bilder unterteilt. Anschließend wird die zweidimensionale Kreuzkorrelationsfunktion der Teilbilder zwischen Abbildung 4.5 (a) und (b) bzw. (a) und (c) berechnet:

$$\text{KKF}(k, l) = \sum_{i, j} E_1(k, l) E_2(k + i, l + j). \quad (4.5)$$

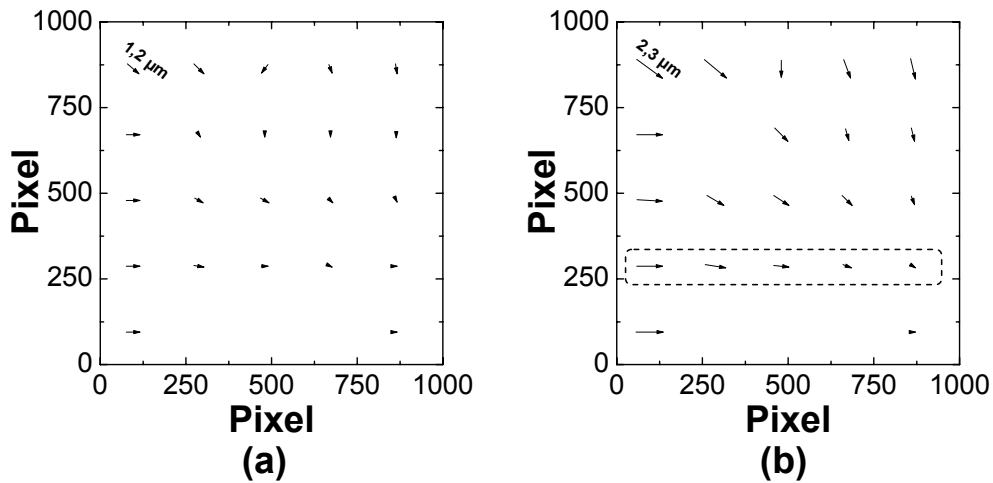


Abbildung 4.6: Überprüfung des Abbildungsmaßstabes mit der KKF: (a) räumliche Verschiebungsverteilung zwischen Abbildung 4.5 (a) und (b), (b) räumliche Verschiebungsverteilung zwischen Abbildung 4.5 (a) und (c).

Die Position des Maximums der Kreuzkorrelationsfunktion liefert Richtung und Betrag der Verschiebung der Teilbilder. Die räumliche Verschiebungsverteilung wird durch die in Abbildung 4.6 (a) und (b) dargestellten Vektorfelder repräsentiert. Da mit der Methode die Verschiebung in den Bereichen des Test-Charts

ohne Strukturen nicht gemessen werden kann, sind an den entsprechenden Positionen keine Werte (Pfeile) eingezeichnet. Die Objektstrukturen in Abbildung 4.5 (c) links oben werden am weitesten verschoben ($2,3 \mu\text{m}$).

In Abbildung 4.7 ist exemplarisch die räumliche Verschiebungsverteilung des in Abbildung 4.6 (b) markierten Bereichs dargestellt. Die Verschiebung der Teilbilder nimmt mit zunehmendem Abstand zur optischen Achse, deren Durchstoßpunkt sich in der rechten unteren Ecke der rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilungen befindet, linear zu. Demzufolge handelt es sich *nur* um einen Skalierungsfehler bei der Abbildung.

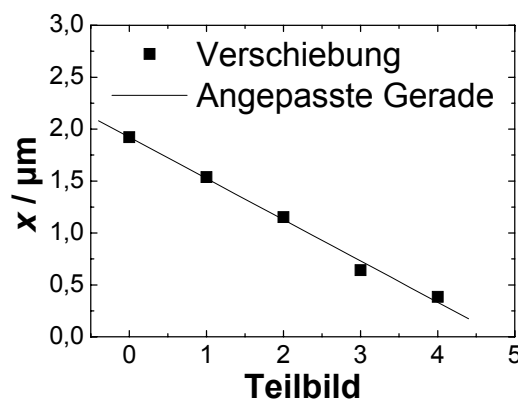


Abbildung 4.7: Verschiebungsverteilung des in Abbildung 4.6 (b) mit der gestrichelten Linie umrandeten Ausschnitts und mit linearer Regression angepasste Gerade.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich trotz des konstanten Sampling-Intervalls bei der Propagation mit der CVM der Abbildungsmaßstab aufgrund der Abbildungseigenschaften des optischen Systems verändern kann. Da die maximale Verschiebung im Vergleich zur Größe des gesamten Bildausschnittes von $125 \mu\text{m} \times 125 \mu\text{m}$ und unter Berücksichtigung des relativ groß gewählten Objektebenenabstandes $\Delta g = 100 \mu\text{m}$ weniger als 2 % beträgt, wird im Rahmen dieser Arbeit auf eine numerische Korrektur des Abbildungsmaßstabes verzichtet.

4.1.5 Diskussion der Ergebnisse und Auswahl der Rekonstruktionsmethode

Tabelle 4.2 zeigt eine Übersicht der in Kapitel 4.1.1 bis 4.1.4 dargestellten Ergebnisse. Im Folgenden werden Kriterien für eine abschließende Bewertung der Eignung der verschiedenen Rekonstruktionsmethoden für die digitalholographische „off-axis“ Mikroskopie ausgewählt. Die einzelnen Punkte werden in Tabelle 4.2 durch den in Klammern stehenden Ausdruck abgekürzt:

- Auftreten von Aliasing-Effekten (AL),
- Überlagerung des „Image“ durch die ebenfalls rekonstruierte nullte Beugungsordnung (NB),
- Weitere Bildverarbeitung zur Verbesserung des Kontrasts der rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilung wegen überstrahlender nullter Beugungsordnung notwendig, z. B. durch eine logarithmische Darstellung (LG),
- Numerische Fokussierung der Objektebene nicht möglich (NF),
- Vergrößerung der Anzahl der diskreten Werte des digitalen Hologramms bzw. des komplexen Arrays der in der Hologrammebene rekonstruierten Objektwelle zur Unterdrückung von Aliasing-Effekten notwendig (GR),
- Rechenzeit (Δt).

Trifft ein Kriterium zu, wird dies in Tabelle 4.2 durch ein Kreuz (\times) gekennzeichnet. Besonders stark auftretende Effekte werden zusätzlich mit Ausrufezeichen (!) markiert.

Alle Rekonstruktionsmethoden, die die DFT ausführen, können Objektebenen mit kleinem Abstand Δg zu der scharf in die Hologrammebene abgebildeten Objektebene nicht fehlerfrei rekonstruieren. Dadurch wird das experimentelle Arbeiten erheblich erschwert, da das zu untersuchende Objekt, z. B. eine lebende Zelle, mit definiertem Objektebenenabstand Δg unscharf abgebildet werden muss. Mit der gleichen Begründung ist auch die direkte Rekonstruktion mit der CVM nicht geeignet. Hier sind nicht Aliasing-Effekte, sondern die gleichzeitig rekonstruierte nullte Beugungsordnung, Ursache dafür, dass rekonstruierte Objektebenen mit kleinem Δg nicht auswertbar sind. Diese zusätzliche Einschränkung gilt auch für die direkte Rekonstruktion mit der DFT.

Demzufolge ist die Rekonstruktion der komplexen Objektwelle in der Hologrammebene, die ohne nullte Beugungsordnung und „Twin-Image“ erfolgt, notwendig. Durchgeführt wird sie entweder durch die Rekonstruktion im Ortsraum mit der NDRM oder durch die Rekonstruktion im Spektralbereich mit der eFTM. Die Qualität der rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilungen beider Methoden ist gleichwertig. Um Rechenzeit zu sparen wird im Folgenden die NDRM eingesetzt.

Die anschließende Propagation der komplexen Objektwelle zur Rekonstruktion weiterer Objektebenen kann entweder mit der DFT oder der CVM durchgeführt werden. Bei der DFT treten bei kleinen Rekonstruktionsabständen Aliasing-Effekte auf (s. o.). Dagegen können mit der CVM Bildebenen mit beliebig

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Rek.	Abb.	$\Delta g/\mu\text{m}$	z/m	z_k/m	$\Delta t/\text{s}$	AL	NB	LG	GR	NF
DFT	4.1 (a)	40	0,089	$< 0,039$	0,8	$\times!!$	$\times!$	\times		
	4.1 (b)	60	0,176	$< 0,039$	0,8	$\times!$	\times	\times		
	4.1 (c)	80	0,400	$< 0,039$	0,8	\times		\times		
CVM	4.1 (d)	40	0,089	$> 0,117$	42		$\times!$	\times	$\times!$	
	4.1 (e)	60	0,176	$> 0,117$	42	\times	\times	\times	$\times!$	
	4.1 (f)	80	0,400	$> 0,117$	42	$\times!!$		\times	$\times!$	
NDRM	4.2 (b)	0	-	-	0,6					\times
	4.2 (f)	0	-	-	0,6					\times
eFTM	4.2 (c)	0	-	-	1,8					\times
	4.2 (g)	0	-	-	1,8					\times
NDRM + DFT	4.4 (a)	10	0,013	$< 0,039$	1,4	$\times!!$				
	4.4 (b)	20	0,028	$< 0,039$	1,4	$\times!$				
	4.4 (c)	90	0,119	$< 0,039$	1,4					
NDRM + CVM	4.4 (d)	10	0,013	$> 0,039$	2,1					
	4.4 (e)	20	0,028	$> 0,039$	2,1					
	4.4 (f)	90	0,119	$> 0,039$	2,1	\times				
	4.5 (b)	50	0,066	$> 0,078$	11				\times	
	4.5 (c)	100	0,132	$> 0,117$	53				$\times!$	

Tabelle 4.2: Vergleich der Rekonstruktionsmethoden; \times : Effekt tritt auf, $\times!(!)$: Effekt tritt (besonders) stark auf, Δg : Objektebenenabstand, z : Rekonstruktionsabstand, z_k : kritischer Bereich des Rekonstruktionsabstandes für das Auftreten von Aliasing-Effekten, Δt : Dauer der Rekonstruktion (PC mit Intel Pentium 4 Prozessor, 2,8 GHz, 2 GB Ram), AL: Aliasing, NB: Überlagerung durch nullte Beugungsordnung, LG: logarithmische Darstellung, GR: Vergrößerung der Anzahl der diskreten Werte notwendig, NF: numerische Fokussierung nicht möglich.

kleinen Abständen z zur Hologrammebene rekonstruiert werden. Die Fresnel-Approximation, die beiden Methoden zugrunde liegt, liefert schon ab einer Länge von ca. zehn Wellenlängen verwertbare Ergebnisse [47]. Ursache für das Auftreten von Aliasing-Effekten ist nicht die Fresnel-Approximation (Kapitel 2.1.2), sondern die Verletzung des Sampling-Theorems bei den diskreten Transformationen 2.26 und 2.37. Außerdem besteht bei der CVM die Möglichkeit, durch Vergrößerung der Anzahl der diskreten Werte des komplexen Arrays der zu propagierenden Objektwelle, Aliasing-Effekte auch bei großen Rekonstruktionsabständen wirksam zu unterdrücken, was aber zu verlängerten Rechenzeiten führt.

Ein weiterer Vorteil der CVM gegenüber der DFT besteht darin, dass keine Koordinatentransformation durchgeführt wird, so dass der Abbildungsmaßstab bei der Propagation konstant bleibt. Dabei kann die durch das abbildende optische System verursachte Veränderung der Bildgröße vernachlässigt werden (Kapitel 4.1.4).

Fazit: Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass für die digitalholographische „off-axis“ Mikroskopie die Methode der Rekonstruktion im Ortsraum mit NDRM und die anschließende Propagation der komplexen Objektwelle mit CVM am besten geeignet ist. Bei großen Objektebenenabständen und demzufolge großen Rekonstruktionsabständen besteht ebenfalls die Möglichkeit mit der deutlich schnelleren DFT zu propagieren. Dabei fällt die Entscheidung entweder zugunsten einer kürzeren Rechenzeit bei der DFT oder zugunsten der bei der Propagation mit der CVM konstant bleibenden Pixelauflösung und des Abbildungsmaßstabes.

4.2 Automatisiertes Anpassen der Rekonstruktionsparameter für die NDRM

Ein im Rahmen dieser Arbeit entwickeltes und implementiertes experimentelles Verfahren zum automatisierten Anpassen der Rekonstruktionsparameter für die NDRM wurde in Kapitel 3.5 beschrieben. In diesem Abschnitt erfolgt die Quantifizierung der Messunsicherheit mit der die Rekonstruktionsparameter bestimmt werden können, indem das Verfahren auf synthetisch generierte Daten angewendet wird. Weiterhin werden Ergebnisse der Anwendung auf experimentell ermittelte Daten dargestellt und diskutiert.

4.2.1 Bestimmung von Näherungswerten

Zur experimentellen Quantifizierung der Messunsicherheit der Rekonstruktionsparameter werden synthetische Hologramme mit vorgegebenen Rekonstruktionsparametern und Modulation generiert. Dazu wird das durch Gleichung 2.63 gegebene Modell der räumlichen Phasenverteilung in der Hologrammebene mit den Rekonstruktionsparametern in die Interferogrammgleichung 2.45 eingesetzt. Den synthetischen Hologrammen wird normalverteiltes Rauschen der Breite 2σ überlagert. Auf diese Weise werden Datensätze mit definiertem Signal-Rausch-Verhältnis γ/σ generiert.

Die Überprüfung der Messunsicherheit, mit der die Näherungswerte der Rekonstruktionsparameter aus der räumlichen Amplitudenverteilung des Raumfrequenzspektrums eines „off-axis“ Hologramms bestimmt werden (Kapitel 3.5.1), erfolgt anhand von 100 synthetisch generierten Hologrammen der Größe 1024×1024 Pixel. Die Rekonstruktionsparameter werden mit Hilfe eines numerischen Zufallsgenerators aus den in Tabelle 4.3 angegebenen Intervallen ausgewählt. Die Standardabweichung des normalverteilten Rauschens, mit dem die Hologramme

überlagert werden, wird ebenfalls zufällig aus dem Intervall $\sigma = [0, \gamma]$ ausgewählt (Gleichung 2.45: $\gamma = 0,1$, $I_0 = 0,5$). Für $\sigma > \gamma$ kann die räumliche Amplitudenverteilung des Raumfrequenzspektrums der generierten Hologramme nicht mit reproduzierbarer Genauigkeit ausgewertet werden.

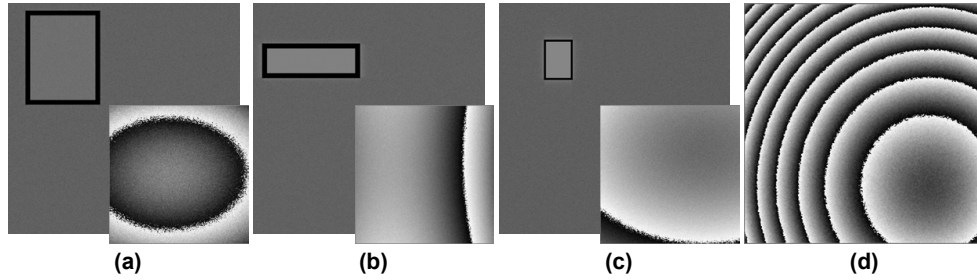


Abbildung 4.8: (a)-(c) Raumfrequenzspektren (logarithmische Darstellung des Betrags) synthetisch generierter „off-axis“ Hologramme. Die schwarzen Rechtecke markieren den Bereich des „Image“ (automatisiert durch Schwellwertdetektion ermittelt). Die zugehörigen mit NDRM rekonstruierten räumlichen Phasenverteilungen mod 2π befinden sich in der rechten unteren Ecke. (d) Mit NDRM rekonstruierte räumliche Phasenverteilung mod 2π , Rekonstruktionsparameter weichen um die in der Simulation ermittelten maximalen Werte von den Parametern des synthetischen Hologramms ab.

Abbildung 4.8 (a) bis (c) zeigt exemplarisch drei räumliche Amplitudenverteilungen der Raumfrequenzspektren von synthetisch generierten „off-axis“ Hologrammen. Die schwarzen Rechtecke markieren den Bereich des „Image“, der automatisiert durch Schwellwertdetektion ermittelt wird. In Abbildung 4.8 (d) ist die mit der NDRM rekonstruierte räumliche Phasenverteilung des synthetischen Hologramms dargestellt, dessen Rekonstruktionsparameter um die in Tabelle 4.3 angegebenen maximalen Beträge (letzte Zeile) von den Parametern des generierten synthetischen Hologramms abweichen („worst case scenario“).

Die in Tabelle 4.3 dargestellten Ergebnisse der Simulation zeigen, dass die Abweichungen der Näherungswerte der Rekonstruktionsparameter sich in einem Bereich befinden, in dem das Sägezahnstreifenmuster der mit der NDRM rekonstruierten räumlichen Phasenverteilungen nur Frequenzanteile weit unterhalb der Nyquist-Frequenz enthält (Abbildung 4.8 (d)). Der Vergleich der Simulation mit den in Kapitel 3.5.1 abgeschätzten Werten für die Messunsicherheit der Rekonstruktionsparameter zeigt Übereinstimmung im Bereich einer Größenordnung. In Kapitel 3.5.1 wird nur eine untere Grenze für den Fehler der Rekonstruktionsparameter abgeschätzt. Durch das den synthetisch generierten Hologrammen überlagerte Rauschen vergrößert sich der Fehler in der Simulation.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

	L_x	L_y	K_x	K_y
Synthetische Hologramme	von 0,23 bis 0,27	von 0,23 bis 0,27	von 0 bis $1,7 \cdot 10^{-4}$	von 0 bis $1,7 \cdot 10^{-4}$
Fehlerabschätzung Gl. 3.13 u. 3.14	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-7}$
Mittlerer Fehler	$4,4 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$
Maximaler Fehler	$4,8 \cdot 10^{-3}$	$4,3 \cdot 10^{-3}$	$8,9 \cdot 10^{-6}$	$8,2 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 4.3: Bereich der gleichverteilten Rekonstruktionsparameter der synthetisch generierten Hologramme, mittlerer und maximaler Fehler bei der Bestimmung der Rekonstruktionsparameter aus der räumlichen Amplitudenverteilung des Raumfrequenzspektrums und Vergleich zu den in Kapitel 3.5.1 abgeschätzten Fehlern.

Fazit: Die Näherungswerte der Rekonstruktionsparameter können durch automatisierte Schwellwertdetektion aus der räumlichen Amplitudenverteilung des Spektrums eines „off-axis“ Hologramms mit ausreichender Genauigkeit für die anschließende Optimierung mit der in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Methode bestimmt werden.

4.2.2 Numerische Optimierung der Parameter

Die in Kapitel 3.5.2 beschriebene Methode zur Optimierung der Rekonstruktionsparameter erfordert das Entfalten jeweils eines horizontalen und eines vertikalen Schnittes durch die mit den Näherungswerten für die Rekonstruktionsparameter mit der NDRM rekonstruierte räumliche Phasenverteilung. Um Fehler beim Entfalten der Schnitte zu minimieren, wird die räumliche Phasenverteilung vor dem Entfalten mit der in Kapitel 3.3 beschriebenen Methode Tiefpass gefiltert.

Daher wird im Folgenden der Einfluss der Filterung auf die Messunsicherheit der Rekonstruktionsparameter untersucht. Dazu werden 100 synthetische Hologramme mit zufälligen Rekonstruktionsparametern und Rauschen generiert. Dabei werden die gleichen Parameter wie bei der in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Simulation verwendet. Für alle Hologramme werden anschließend die Rekonstruktionsparameter durch Anpassen eines Polynoms zweiten Grades an einen horizontalen und einen vertikalen Schnitt durch die mit der NDRM rekonstruierte räumliche Phasenverteilung bestimmt (Kapitel 3.5.2).

Dieser Vorgang wird für die Glättungsradien $R_{GL} = 1$ bis 6 und die Anzahl der Glättungen $N_{GL} = 1$ bis 10 für jeweils 100 synthetische Hologramme durchgeführt. Abbildung 4.9 zeigt exemplarisch den durchschnittlichen Fehler und den

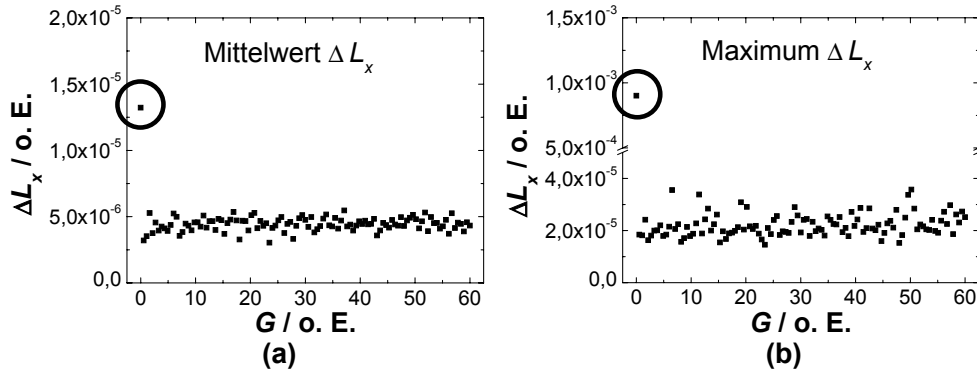


Abbildung 4.9: (a) Mittlerer Fehler, (b) maximaler Fehler der bestimmten Rekonstruktionsparameter (exemplarisch für L_x) über der „Stärke“ des Tiefpassfilters $G = 10 \times (R_{GL} - 1) + (N_{GL} - 1)$ mit $R_{GL} = [1, 6]$ und $N_{GL} = [1, 10]$ aufgetragen.

maximalen Fehler des Rekonstruktionsparameters L_x über der „Stärke“ des Tiefpassfilters G . Das Verhalten der Rekonstruktionsparameter L_y , K_x und K_y ist dazu identisch, weshalb auf die Darstellung der Ergebnisse verzichtet wird. Die Stärke der Tiefpassfilterung hat demnach keinen erkennbaren Einfluss auf die Messunsicherheit der Rekonstruktionsparameter.

Der Fall ohne Filterung (schwarz eingekreiste Messpunkte in Abbildung 4.9) zeigt aber, dass eine Tiefpassfilterung der rekonstruierten Phasenverteilung zur Minimierung von Entfaltungsfehlern notwendig ist. Zur Veranschaulichung der Problematik ist dazu in Abbildung 4.10 (a) exemplarisch ein ungefilterter Schnitt durch die rekonstruierte Phasenverteilung und der zugehörige entfaltete Schnitt mit angepasstem Polynom zweiten Grades dargestellt. Bedingt durch Rauschen in der rekonstruierten räumlichen Phasenverteilung kommt es zu Entfaltungsfehlern (eingekreister Bereich). Abbildung 4.10 (b) zeigt den mit $N_{GL} = 5$ und $R_{GL} = 3$ Tiefpass gefilterten Schnitt ohne Entfaltungsfehler.

Zur Bestimmung des Einflusses des Modulations-Rausch-Verhältnisses auf die Messunsicherheit der bestimmten Rekonstruktionsparameter werden je 100 synthetische Hologramme für zehn verschiedene Modulations-Rausch-Verhältnisse im Intervall $\gamma/\sigma = [0,5, 2]$ generiert. Die übrigen freien Parameter der synthetischen Hologramme entsprechen dabei der in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Simulation. Anschließend wird die mittlere Abweichung der bestimmten Rekonstruktionsparameter für die verschiedenen Modulations-Rausch-Verhältnisse berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.11 aufgetragen.

Bis zu einem Modulations-Rausch-Verhältnis $\gamma/\sigma \approx 1,0$ beträgt die Messunsicherheit der Rekonstruktionsparameter in der Simulation $\Delta L_{x,y} \leq 1,0 \cdot 10^{-5}$ und $\Delta K_{x,y} \leq 3,5 \cdot 10^{-8}$. Bei einer Hologrammgröße von 1024×1024 Pixeln ergibt sich

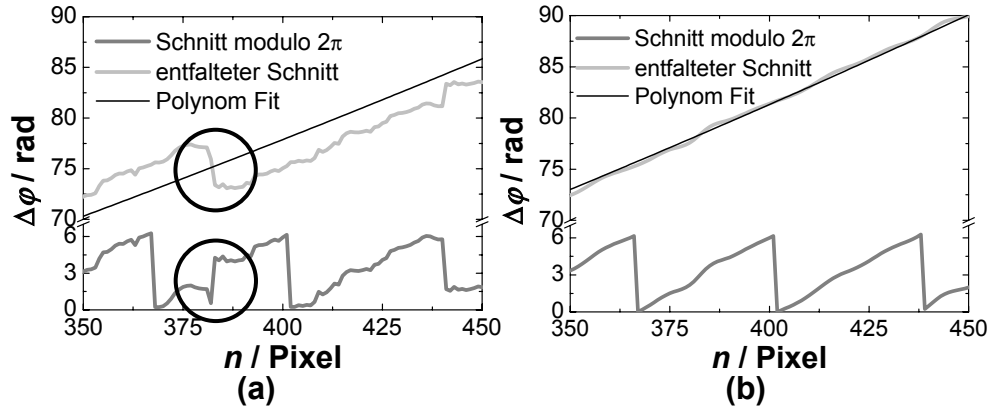


Abbildung 4.10: Schnitt durch eine mit der NDRM rekonstruierte räumliche Phasenverteilung, entfalteter Schnitt und an den entfalteten Schnitt angepasstes Polynom zweiten Grades: (a) kein Filter (Kreise markieren einen Fehler beim Entfalten), (b) mit $N_{GL} = 5$, $R_{GL} = 3$ Tiefpass gefilterter Schnitt.

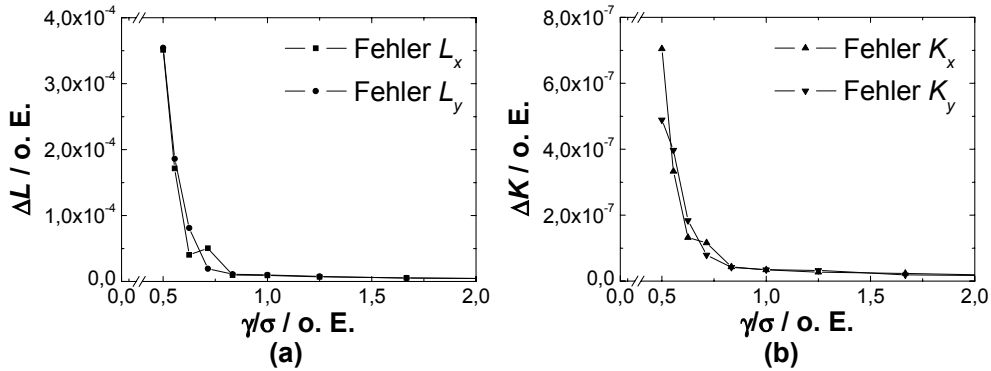


Abbildung 4.11: Gemittelter Fehler der durch Anpassen eines Polynoms an die mit der NDRM rekonstruierten räumlichen Phasenverteilungen bestimmten Rekonstruktionsparameter aufgetragen über dem Modulations-Rausch-Verhältnis: (a) für L_x , L_y , (b) für K_x , K_y .

durch Einsetzen von $L_x = L_y = 1,0 \cdot 10^{-5}$, $K_x = K_y = 3,5 \cdot 10^{-8}$ und $k = l = 1024$ in Gleichung 2.63 ein Größtfehler von $\Delta\phi_{\max} = 0,59$ rad am Rand der rekonstruierten räumlichen Phasenverteilung (entspricht $\approx \frac{1}{10}$ Streifen). Für $\gamma/\sigma < 1,0$ treten Fehler beim Entfalten der Schnitte durch die rekonstruierten räumlichen Phasenverteilungen auf, so dass das Anpassen der Rekonstruktionsparameter nicht mehr mit reproduzierbarer Genauigkeit möglich ist.

4.2.3 Anwendung auf experimentelle Daten

In diesem Abschnitt wird die Methode des automatisierten Anpassens der Rekonstruktionsparameter für die NDRM auf experimentell gemessene Daten angewendet. Es werden digital aufgezeichnete Hologramme von biologischen Objekten in Durchlichtanordnung (Abbildung 3.1) und eines technischen Objekts in Auflichtanordnung (Abbildung 3.2) ausgewertet.

Beispiel 1: Mit der in Abbildung 3.1 dargestellten experimentellen Anordnung (Durchlicht) wird zum Anpassen der Rekonstruktionsparameter ein Hologramm ohne Objekt im Strahlengang aufgenommen. Zur Vergrößerung wird ein 20x Mikroskopobjektiv ($NA = 0,4$) eingesetzt. Abbildung 4.12 (a) zeigt die Amplitudenverteilung des Raumfrequenzspektrums des Hologramms. Aus der Größe und Lage des „Image“ in Abbildung 4.12 (a) werden Näherungswerte für die Rekonstruktionsparameter mit den in Kapitel 3.5.1 hergeleiteten Beziehungen berechnet. Die anschließende Rekonstruktion mit NDRM ergibt die in Abbildung 4.12 (b) dargestellte räumliche Phasenverteilung. Erst die Optimierung der Rekonstruktionsparameter mit der in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Methode liefert die in Abbildung 4.12 (c) dargestellte homogene räumliche Phasenverteilung (Standardabweichung: $\sigma_\varphi = 0,20$ rad).

Nach der Anpassung der Rekonstruktionsparameter wird das Hologramm einer frisch auf einem Objektträger präparierten Zwiebelhaut aufgezeichnet. Abbildung 4.12 (d) zeigt die zugehörige Amplitudenverteilung des Raumfrequenzspektrums des Hologramms. Die mit der NDRM und den ohne Objekt im Strahlengang bestimmten Rekonstruktionsparametern rekonstruierte räumliche Amplituden- und Phasenverteilung der Zwiebelhaut sind in den Abbildungen 4.12 (e) und (f) dargestellt. Die räumliche Phasenverteilung entspricht der durch das Objekt gegenüber dem umgebenden Medium (hier Luft) bewirkte Änderung der optischen Weglänge.

Beispiel 2: Nicht in jedem Fall ist es erforderlich zum Anpassen der Rekonstruktionsparameter ein Hologramm ohne Objekt aufzunehmen. Abbildung 4.13 zeigt die Ergebnisse eines mit der in Abbildung 3.2 dargestellten experimentellen Anordnung (Auflicht) aufgenommen Hologramms eines transparenten USAF 1951 Test-Charts (Chrom auf Glas). Zur Vergrößerung wird erneut das 20x Mikroskopobjektiv ($NA = 0,4$) eingesetzt. Vor der CCD-Kamera befindet sich zur Unterdrückung von parasitärem Streulicht eine Irisblende. Die Form der Apertur findet sich in der Form des „Image“ in der Amplitudenverteilung des Raumfrequenzspektrums in Abbildung 4.13 (d) wieder.

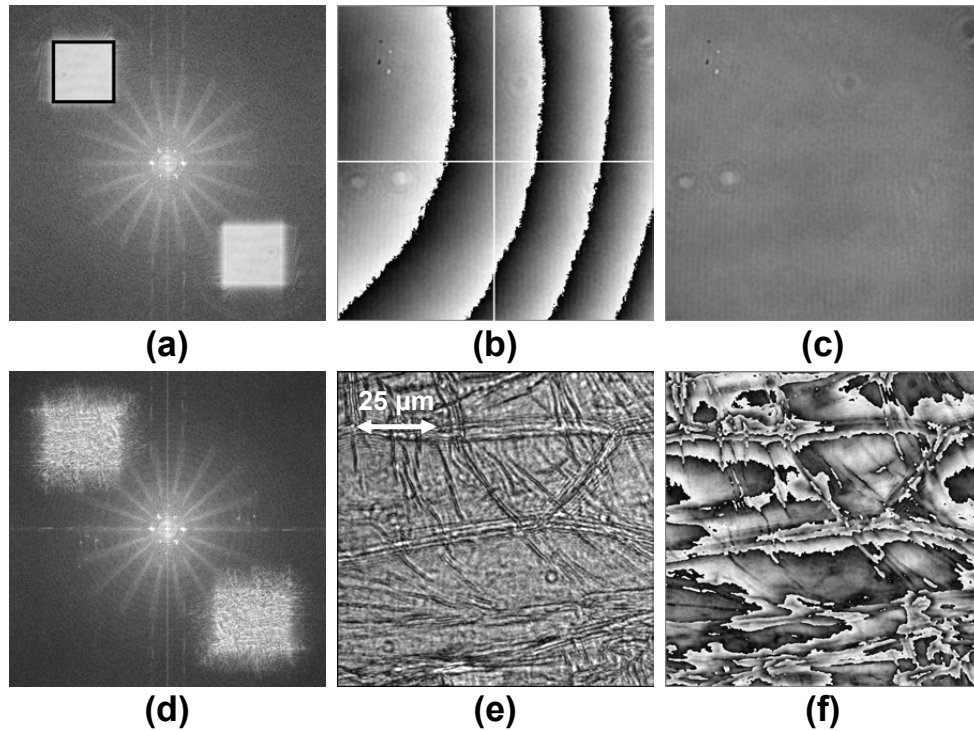


Abbildung 4.12: (a) Amplitudenverteilung des Raumfrequenzspektrums eines in Durchlichtanordnung aufgenommenen Hologramms ohne Objekt, (b) Mit NDRM rekonstruierte räumliche Phasenverteilung mod 2π mit aus (a) bestimmten Näherungswerten für die Rekonstruktionsparameter, (c) rekonstruierte Phasenverteilung mod 2π nach Optimierung der Rekonstruktionsparameter, (d) Amplitudenverteilung des Raumfrequenzspektrums des Hologramms einer Zwiebelzelle, (e) rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung der Zwiebelzelle, (f) zugehörige Phasenverteilung mod 2π .

Abbildung 4.13 (a) zeigt die mit den Näherungswerten für die Rekonstruktionsparameter mit der NDRM rekonstruierte räumliche Phasenverteilung. Entlang der weißen Linien werden Schnitte durch die räumliche Phasenverteilung entfaltet und Polynome zweiten Grades angepasst. Exemplarisch zeigt Abbildung 4.13 (b) den horizontalen Schnitt durch die Bildmitte der räumlichen Phasenverteilung. Durch die Morphologie des Objekts in diesem Bereich (Chrom Elemente der Gruppe 7.3 des USAF 1951 Test-Charts) und Störungen am Rand der Phasenverteilung durch die Irisblende kann das Polynom nicht optimal an den entfalten Schnitt angepasst werden. Daher enthält die in Abbildung 4.13 (c) dargestellte mit der NDRM rekonstruierte Phasenverteilung 2π -Phasensprünge, die nicht der Morphologie des Objekts entsprechen.

Um Fehler beim Anpassen der Polynome zu minimieren wird der in Abbildung

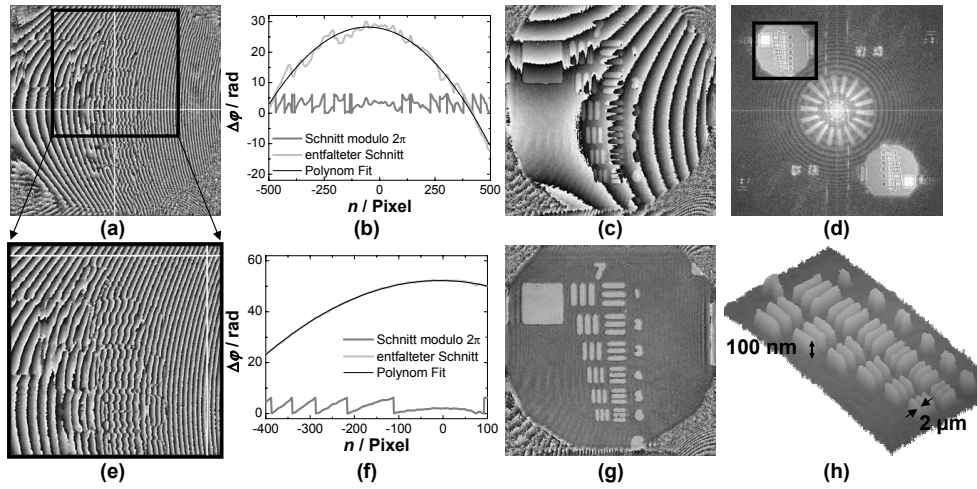


Abbildung 4.13: (a) Mit der NDRM rekonstruierte räumliche Phasenverteilung mod 2π eines in Auflichtanordnung aufgenommenen Hologramms eines transparenten USAF 1951 Test-Charts (Rekonstruktionsparameter aus (d) bestimmt), (b) horizontaler Schnitt entlang der weißen Linie in (a) und entfalteter Schnitt mit angepasstem Polynom, (c) rekonstruierte Phasenverteilung mod 2π (entfaltete Schnitte zur Bestimmung der Rekonstruktionsparameter entlang der weißen Linien in (a) angepasst), (d) Raumfrequenzspektrum des Hologramms (logarithmische Darstellung), (e) Ausschnitt aus (a), (f) horizontaler Schnitt entlang der weißen Linie in (e), (g) wie (c), aber Schnitte entlang der weißen Linien in (e), (h) 3D-Darstellung eines Ausschnitts aus (g).

4.13 (e) dargestellte Ausschnitt aus Abbildung 4.13 (a) ausgewählt. Im Bereich dieses Ausschnitts befinden sich nur wenige Objektstrukturen. Die räumliche Phasenverteilung enthält keine Störungen, die z. B. durch eine Blende oder parasitäres Streulicht verursacht werden, und das Sägezahnstreifenmuster wird vollständig (kein Aliasing) aufgelöst. Zusätzlich werden die Schnitte in der Phasenverteilung an Stellen positioniert, die keine Objektstrukturen enthalten (plane Glasoberfläche). Abbildung 4.13 (f) zeigt exemplarisch den horizontalen Schnitt durch die Phasenverteilung mod 2π , den entfalteten Schnitt und das daran angepasste Polynom zweiten Grades. Im Vergleich zu Abbildung 4.13 (b) sind geringere Abweichungen des angepassten Polynoms zum entfalteten Schnitt zu erkennen. Dadurch ergeben sich genauer angepasste Rekonstruktionsparameter, was der Vergleich der in Abbildung 4.13 (g) dargestellten rekonstruierten Phasenverteilung mit Abbildung 4.13 (c) bestätigt. Abbildung 4.13 (h) zeigt die 3D-Darstellung der Gruppe 7 des USAF 1951 Test-Charts. Die Topographie des in Auflichtanordnung vermessenen Objekts lässt sich mit Gleichung 3.8 aus der rekonstruierten räumlichen Phasenverteilung berechnen. Die Höhe der Chromstrukturen beträgt ≈ 100 nm.

Die Phasenauflösung des Systems bei der Topographiemessung wird in Kapitel 4.3.5 quantifiziert.

Beispiel 3: Bei Messungen über mehrere Minuten oder Stunden, die z. B. bei der Untersuchung von Zellmigration erforderlich sind, treten durch Setzungserscheinungen und thermische Ausdehnung der mechanischen Komponenten des Aufbaus i. A. Veränderungen der räumlichen Phasenverteilung in der Hologrammebene auf. Werden Objekte in einem Flüssigkeitsfilm untersucht, verursachen kleinste Erschütterungen, z. B. Gebäudeschwingungen, die durch umherlaufende Personen und Straßenverkehr entstehen, sowie thermische Fluktuationen Bewegungen der Flüssigkeit, was ebenfalls zu Änderungen der räumlichen Phasenverteilung führt. Derartige Störungen sind der rekonstruierten räumlichen Phasenverteilung der Objektwelle überlagert und beeinträchtigen die Messergebnisse.

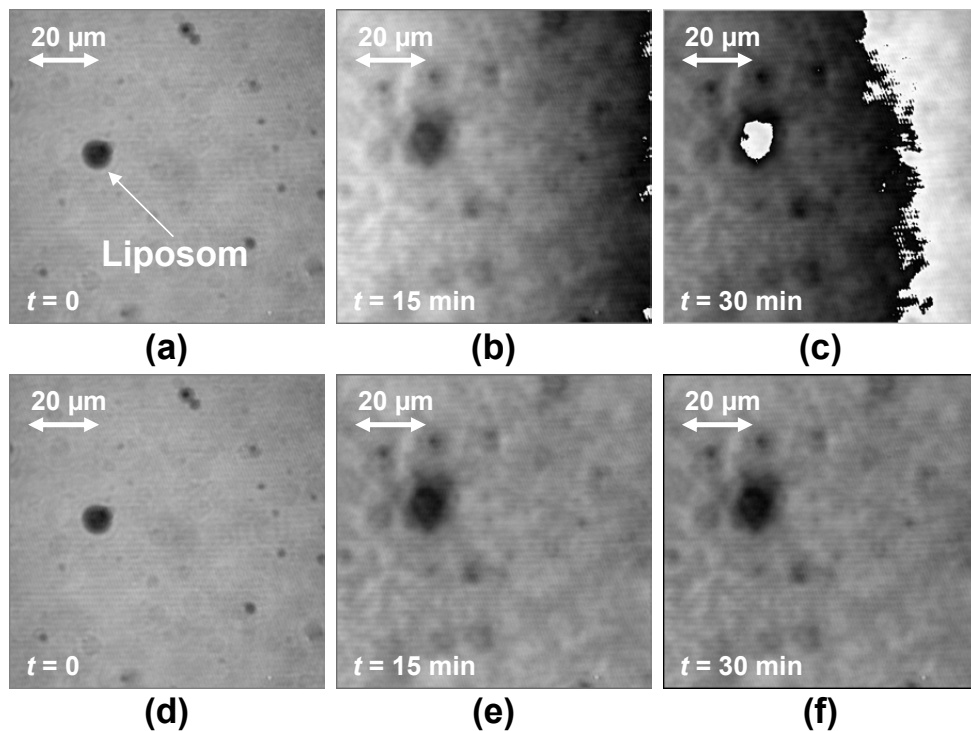


Abbildung 4.14: Mit NDRM rekonstruierte räumliche Phasenverteilungen mod 2π von in einem dünnen Flüssigkeitsfilm auf einem Objektträger aufgetragenen Liposomen mit zu Beginn der Messung angepassten Rekonstruktionsparametern: (a) $t = 0$, (b) $t = 15$ min, (c) $t = 30$ min und mit für jedes Hologramm angepassten Parametern: (d) $t = 0$, (e) $t = 15$ min, (f) $t = 30$ min.

Abbildung 4.14 zeigt exemplarisch Ergebnisse einer Messung an Liposomen¹, die in einem dünnen Flüssigkeitsfilm auf einem Objektträger aufgebracht sind. Ziel der Messung ist die Untersuchung des Austrocknungsprozesses von Liposomen. Den in der oberen und unteren Reihe dargestellten mit der NDRM rekonstruierten räumlichen Phasenverteilungen liegen die gleichen experimentellen Daten zugrunde (Hologramme zu den Zeitpunkten $t = 0$, $t = 15$ min und $t = 30$ min). Die Rekonstruktionsparameter der in den Abbildungen 4.14 (a) bis (c) dargestellten Phasenverteilungen werden zu Beginn der Messung angepasst und im Laufe des Experiments nicht verändert. Im Vergleich dazu werden die Rekonstruktionsparameter der in den Abbildungen 4.14 (d) bis (f) dargestellten Phasenverteilungen für jedes Hologramm erneut angepasst. Dadurch werden die Störungen, die in der oberen Reihe in Form von räumlichen „Phasendriffs“ auftreten, deutlich minimiert.

4.2.4 Diskussion des Verfahrens zum Anpassen der Parameter

Das hier untersuchte Verfahren zum Anpassen der Rekonstruktionsparameter unterteilt sich in zwei Punkte. In einem ersten Schritt werden Näherungswerte für die Rekonstruktionsparameter aus der Lage und Größe des „Image“ in der räumlichen Amplitudenverteilung des Raumfrequenzspektrums eines digitalen Hologramms bestimmt. Die Simulation (Kapitel 4.2.1) zeigt, dass die Näherungswerte bis zu einem Modulations-Rausch-Verhältnis von $\gamma/\sigma \approx 1,0$ mit ausreichender Genauigkeit ($\Delta L_{x,y} \approx 10^{-3}$ und $\Delta K_{x,y} \approx 10^{-6}$) bestimmt werden können, d. h. das Sägezahnstreifenmuster der mit den bestimmten Näherungswerten rekonstruierten räumlichen Phasenverteilung enthält nur Frequenzanteile deutlich unterhalb der Nyquist-Frequenz. Die Ergebnisse der Simulation stimmen in der Größenordnung mit der in Kapitel 3.5.1 beschriebenen Fehlerabschätzung überein. Sie bestätigen damit, dass die in diesem ersten Schritt bestimmten Werte für die Rekonstruktionsparameter nur Näherungswerte sind, so dass eine weitere Anpassung der Parameter erforderlich ist.

Im zweiten Schritt werden die Rekonstruktionsparameter durch Anpassen eines zweidimensionalen Polynoms an die mit den Näherungswerten für die Re-

¹Liposome sind sehr kleine kugelförmige Gebilde aus Phospholipiden, die einen wässrigen Innenraum umschließen, der noch weitere konzentrische Phospholipidbläschen enthalten kann. Liposome haben sich zu einem vielversprechenden Applikationssystem in der Medizin entwickelt: Arzneimittel können in Liposomen eingeschlossen werden, sich so in den Zielorganen und -geweben effizient anreichern und dort ihre Wirkung entfalten. In der Gentechnik werden mit Nucleinsäuren beladene Liposomen zu deren gezielten Einführung in Zielzellen eingesetzt (Lipofektion). Die Spezifität zu den Zielzellen kann durch mit Antikörpern versehene Liposomen erhöht werden [93].

konstruktionsparameter mit der NDRM rekonstruierte räumliche Phasenverteilung optimiert. Die schnelle Anpassung des zweidimensionalen Polynoms wird durch das Anpassen zweier eindimensionaler Polynome an einen horizontalen und einen vertikalen Schnitt durch die räumliche Phasenverteilung realisiert. Bei der Simulation von idealen synthetischen Hologrammen mit einem Modulations-Rausch-Verhältnis von $\gamma/\sigma \geq 1,0$ werden die Rekonstruktionsparameter bis auf einen Fehler von $\Delta L_{x,y} \leq 1,0 \cdot 10^{-5}$ und $\Delta K_{x,y} \leq 3,5 \cdot 10^{-8}$ bestimmt. Im Fall eines 1024×1024 Pixel großen Hologramms ergibt sich für die rekonstruierte Phase damit ein Größtfehler von $\Delta\phi_{\max} = 0,59$ rad. Der durch abweichende Rekonstruktionsparameter verursachte Fehler der rekonstruierten räumlichen Phasenverteilung ist in die Kategorie Fixed-Pattern-Noise einzuordnen, d. h. die Phasenauflösung des Verfahrens wird dadurch nicht auf $\Delta\phi_{\max} = 0,59$ rad beschränkt.

Für $\gamma/\sigma \ll 1,0$ treten Fehler beim Entfalten der mod 2π vorliegenden Schnitte durch die rekonstruierte räumliche Phasenverteilung auf, wodurch der Fehler bei der Bestimmung der Rekonstruktionsparameter um mehrere Größenordnungen zunimmt (Abbildung 4.11). Die Rekonstruktion einer homogenen räumlichen Phasenverteilung ist dann nicht möglich.

Die rekonstruierten räumlichen Phasenverteilungen experimentell aufgezeichneter Hologramme weichen stärker von einer idealen homogenen räumlichen Phasenverteilung ab als die der synthetisch generierten Hologramme. Ursache dafür sind Abweichungen der räumlichen Phasenverteilung in der Hologrammebene, die durch das mathematische Modell (Gleichung 2.63) nicht berücksichtigt werden, z. B. Störungen durch parasitäres Streulicht und nicht ideale optische Komponenten. Das führt zu Fixed-Pattern-Noise in der rekonstruierten räumlichen Phasenverteilung. Ein Beispiel für das Auftreten von Fixed-Pattern-Noise sind die in Abbildung 4.12 (c) (Bildmitte links und rechte obere Ecke) rekonstruierten ringförmigen Strukturen, deren Ursache in fertigungsbedingten Mängeln des verwendeten Strahlteilerwürfels liegt. Da die Rekonstruktionsparameter nicht von der Lage der Schnitte durch die räumliche Phasenverteilung abhängig sind, können die Schnitte in einem Bereich, der nur wenige Störungen enthält, platziert werden (Abbildung 4.13 (e)).

Änderungen der Phasenbeziehung zwischen Objekt- und Referenzwelle, z. B. durch thermische Fluktuationen, mechanische Instabilität oder Erschütterungen im interferometrischen Aufbau während einer Messung, können durch automatisiertes Anpassen der Parameter für jedes neu aufgezeichnete Hologramm kompensiert werden. Besonders für die Auswertung von Langzeitmessungen ist das sehr wichtig (Abbildung 4.14).

Die Zeit zum Anpassen der Rekonstruktionsparameter beträgt für ein Hologramm der Größe 1024×1024 Pixel $0,7 \text{ s} \pm 0,1 \text{ s}$ zur Bestimmung der Nähe-

rungswerte und $2,4 \text{ s} \pm 0,1 \text{ s}$ zur Optimierung der Parameter (PC mit Intel Pentium 4 Prozessor, 2,8 GHz und 2 GB Ram). Im Gegensatz dazu sind für das empirische Optimieren der Rekonstruktionsparameter mehrere Minuten pro Hologramm erforderlich. Reproduzierbare Genauigkeit kann dabei nur mit großem Aufwand erzielt werden.

Fazit: Die Ergebnisse der Simulation (Kapitel 4.2.1 und 4.2.2) und die Anwendung auf experimentelle Daten (Kapitel 4.2.3) zeigen, dass das entwickelte Verfahren zur automatisierten Bestimmung der Rekonstruktionsparameter für die NDRM geeignet ist.

4.3 Systemcharakterisierung und Optimierung

In diesem Abschnitt erfolgt die Beschreibung der Charakterisierung und Optimierung des Systems zur digitalholographischen Mikroskopie. Zuerst wird das Anpassen der „off-axis“ Geometrie und die Optimierung der Objektbeleuchtung erläutert. Im Anschluss werden Ergebnisse von Messungen zur experimentellen Überprüfung der in Kapitel 2.5 hergeleiteten Beziehungen zwischen Objektebenenabstand und Rekonstruktionsabstand vorgestellt. Es folgt die Quantifizierung der lateralen Auflösung und der Phasenauflösung des Systems anhand der Ergebnisse von Untersuchungen an technischen Objekten, die in Auflicht- und Durchlichtanordnung durchgeführt werden. Abschließend erfolgt die Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse.

4.3.1 Anpassung der „off-axis“ Geometrie

Zum Vergleich verschiedener Realisierungen der „off-axis“ Anordnung werden mit einem experimentellen Aufbau gemäß Abbildung 3.1 Hologramme eines transparenten USAF 1951 Test-Charts aufgezeichnet. Dabei werden die Strukturen des Test-Charts mit einem 20x Mikroskopobjektiv ($NA = 0,4$) scharf auf den CCD-Sensor abgebildet. Die Hologrammaufnahme erfolgt mit der CCD-Kamera Sony XCD-SX900. Der Winkel zwischen Objekt- und Referenzwelle wird durch Verkippen und Drehen des Strahlteilerwürfels (ST2) eingestellt. Gleichzeitig wird zur Überprüfung einer reproduzierbaren Justage die räumliche Amplitudenverteilung des Raumfrequenzspektrums des Hologramms dargestellt. Die Darstellung des Raumfrequenzspektrums erfolgt logarithmisch, da der enthaltende Gleichanteil des Raumfrequenzspektrums das restliche Bild ansonsten

überstrahlt. Durch unterschiedliche Positionierung der Seitenbänder im Raumfrequenzspektrum werden verschiedene „off-axis“ Anordnungen eingestellt und Hologramme aufgezeichnet.

Abbildung 4.15 zeigt exemplarisch die Amplitude der Raumfrequenzspektren von in charakteristischen „off-axis“ Positionen aufgezeichneten Hologrammen und die zugehörigen mit der NDRM rekonstruierten räumlichen Amplituden- und Phasenverteilungen.

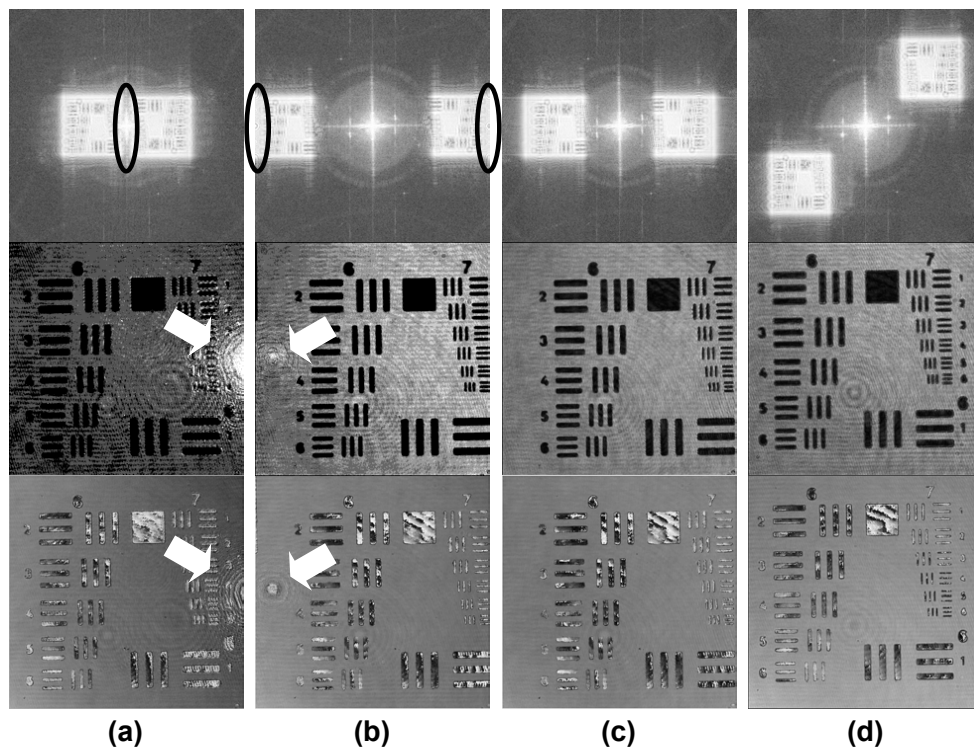


Abbildung 4.15: Verschiedene „off-axis“ Konfigurationen: (oben) Raumfrequenzspektrum (logarithmische Darstellung), (Mitte) mit der NDRM rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung, (unten) zugehörige Phasenverteilung mod 2π .

Bedingt durch die divergente Objektwelle, die durch das zur Vergrößerung eingesetzte Mikroskopobjektiv generiert wird, ist die räumliche Verteilung des Phasengradienten im Hologramm inhomogen. Daher führt eine lokale Störung des Seitenbandes im Raumfrequenzspektrum auch zu lokalen Störungen der rekonstruierten Amplituden- und Phasenverteilung. In Abbildung 4.15 (a) und (b) sind derartige Bereiche im Raumfrequenzspektrum durch schwarze Ellipsen (oben) und im Ortsraum durch weiße Pfeile (Mitte, unten) markiert. Im Fall (a) besitzt das Raumfrequenzspektrum des Trägerstreifenmusters Anteile um Null, d. h. es gibt Bereiche im Hologramm ohne Trägerstreifen b.z.w. mit Trägerstreifen sehr

niedriger Frequenz. Dadurch treten Fehler bei der Rekonstruktion mit der NDRM auf. Übertragen auf die Rekonstruktion mit der DFT entspricht das dem Fall, dass das „Image“ räumlich nicht ausreichend von der nullten Beugungsordnung und dem „Twin-Image“ getrennt ist. Fall (b) repräsentiert das andere Extrem, hier tritt Aliasing durch Verletzung des Sampling-Theorems auf, d. h. die Raumfrequenzen der Trägerstreifen sind zu groß und werden daher nicht richtig detektiert und können folglich auch nicht rekonstruiert werden.

Der Vergleich der Abbildungen 4.15 (c) und (d) zeigt, dass die Orientierung des Trägerstreifenmusters (vertikal bzw. diagonal) keinen ersichtlichen Einfluss auf die horizontale und laterale Auflösung der rekonstruierten Amplituden- und Phasenverteilung hat. In beiden Fällen werden sowohl die horizontalen als auch die vertikalen Linien der kleinsten Gruppe (7.6) des transparenten USAF 1951 Test-Charts mit einer Linienbreite von $2,2 \mu\text{m}$ gleichermaßen scharf und kontrastreich rekonstruiert.

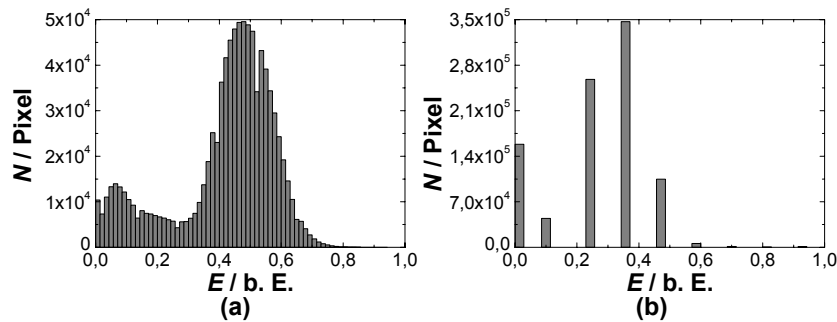


Abbildung 4.16: Histogramme der rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilungen: (a) aus Abbildung 4.15 (d), (b) aus Abbildung 4.15 (b).

Den Einfluss nicht optimal eingestellter Trägerstreifen auf die rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung macht der Vergleich der in Abbildung 4.16 aufgetragenen Histogramme der in Abbildung 4.15 (b) und (d) dargestellten rekonstruierten Amplitudenverteilungen deutlich. Singularitäten in der räumlichen Amplitudenverteilung (Abbildung 4.15 (b)) verursachen beim Skalieren des Bildes auf 8 bit (Darstellung auf dem Monitor, Speichern im BMP-Format) extrem hohes Quantisierungsrauschen (Abbildung 4.16 (b)).

Zur Untersuchung des Rauschens der rekonstruierten räumlichen Phasenverteilung werden bei Einstellung der in Abbildung 4.15 (a) und (b) dargestellten „off-axis“ Anordnungen Hologramme ohne Objekt im Strahlengang aufgezeichnet. Die mit der NDRM rekonstruierten räumlichen Phasenverteilungen sind in Abbildung 4.17 dargestellt. Sie enthalten die gleichen Störungen wie die rekonstruierten Phasenverteilungen des USAF 1951 Test-Charts in Abbildung 4.15 (a)

und (b), die durch weiße Pfeile markiert sind. Wegen der inhomogenen räumlichen Verteilung des Phasengradienten kann jedem Punkt der räumlichen Phasenverteilung ein bestimmter Phasengradient zugeordnet werden. Deshalb wird zur räumlichen Auflösung des Phasenrauschens in äquidistanten Abständen von 20 Pixeln entlang eines horizontalen Schnittes durch die Bildmitte die Standardabweichung einer 40×40 Pixel großen ROI berechnet.

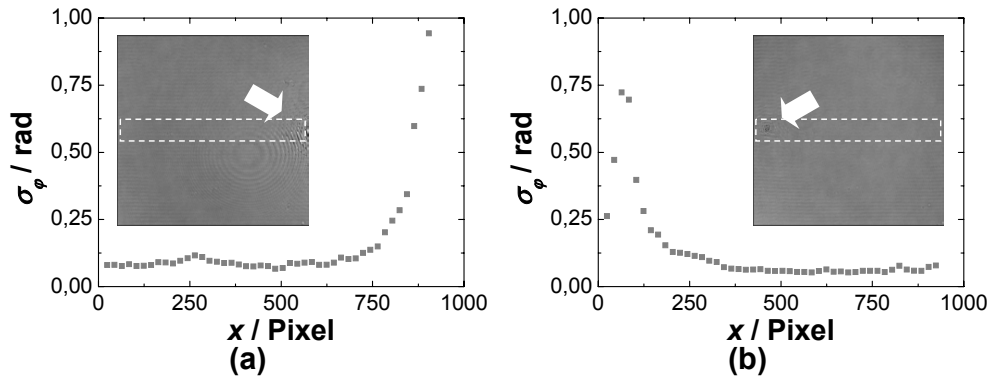


Abbildung 4.17: Entlang der markierten horizontalen Schnitte durch die rekonstruierten räumlichen Phasenverteilungen berechnete Standardabweichungen (ROI: 40×40 Pixel), (a) „off-axis“ Anordnung entsprechend Abbildung 4.15 (a), (b) entsprechend Abbildung 4.15 (b).

Fazit: Die in Abbildung 4.17 dargestellten Kurven bestätigen, dass die Erhöhung des Rauschens in den rekonstruierten räumlichen Phasenverteilungen lokal auf Bereiche ohne Trägerstreifen (Frequenzanteile nahe Null) und unterabgetastete Trägerstreifen (Aliasing) begrenzt ist. In den Bereichen der räumlichen Phasenverteilung bei denen die zugehörigen Bereiche im Raumfrequenzspektrum deutlich von der Mitte und dem Rand des Spektrums getrennt sind ist das Phasenrauschen nahezu konstant und beträgt $\sigma_\varphi = 0,06 \text{ rad} \pm 0,02 \text{ rad}$.

4.3.2 Optimierung der Objektbeleuchtung

4.3.2.1 Durchlichtanordnung

Mit einem Aufbau gemäß Abbildung 3.1 werden mit einem 40x Mikroskopobjektiv ($NA = 0,6$) Hologramme eines negativ USAF 1951 Test-Cahrts aufgezeichnet. Dabei wird das Objekt, wie in Abbildung 4.18 (a) dargestellt, mit einem kollimierten Strahl beleuchtet. Anschließend erfolgt die Optimierung der Objektbeleuch-

tung durch Justage des Raumfrequenzfilters, der Aperturblende und der Kondensorlinse, so dass möglichst nur der untersuchte Bereich des Objekts beleuchtet wird (Abbildung 4.18 (b)).

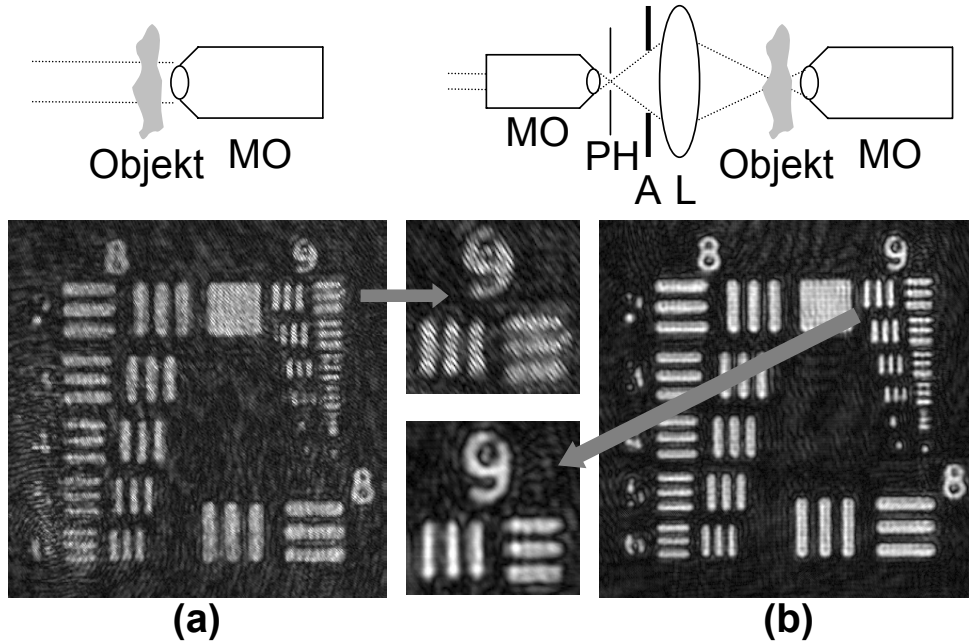


Abbildung 4.18: Rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung mit Ausschnittsvergrößerung der Gruppe 9.1 des USAF 1951 negativ Test-Charts, aufgenommen mit einem 40x Mikroskopobjektiv ($NA = 0,6$) und Prinzipskizze der Objektbeleuchtung: (a) kollimierter Strahl (Durchmesser ≈ 1 mm), (b) mit optimierter Beleuchtung.

Die in Abbildung 4.18 (b) dargestellte rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung zeigt besonders bei feinen Strukturen eine deutliche Verbesserung des Kontrasts und der Bildschärfe gegenüber Abbildung 4.18 (a). Der Kontrast $\left(K = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}}\right)$ der Linien der Gruppe 9 des USAF 1951 Test-Charts wird durch die Optimierung der Objektbeleuchtung um ≈ 20 % erhöht.

Weiterhin zeigt der Vergleich der vergrößert dargestellten Gruppe 9.1 exemplarisch, dass bei der Beleuchtung mit einem kollimierten Strahl die rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung von einem hochfrequenten Streifenmuster, das dem Trägerstreifenmuster des digitalen Hologramms entspricht, überlagert ist (Abbildung 4.18 (a)). Nach Ausblenden des parasitären Streulichts sind diese Störungen in der rekonstruierten Amplitudenverteilung nicht mehr nachweisbar (Abbildung 4.18 (b)).

4.3.2.2 Auflichtanordnung

Die Optimierung der Auflichtbeleuchtung des in Abbildung 3.2 dargestellten Aufbaus wird durch Feinpositionierung der Linse (L2) und der Aperturblende (A) realisiert. Neben einer homogenen Ausleuchtung der Objektoberfläche ist bei kohärenter Auflichtbeleuchtung besonders zu beachten, dass die Objektwelle nicht von einem Interferenzstreifenmuster, das durch Vielfachreflexionen, z. B. im Mikroskopobjektiv, entstehen kann, überlagert wird.

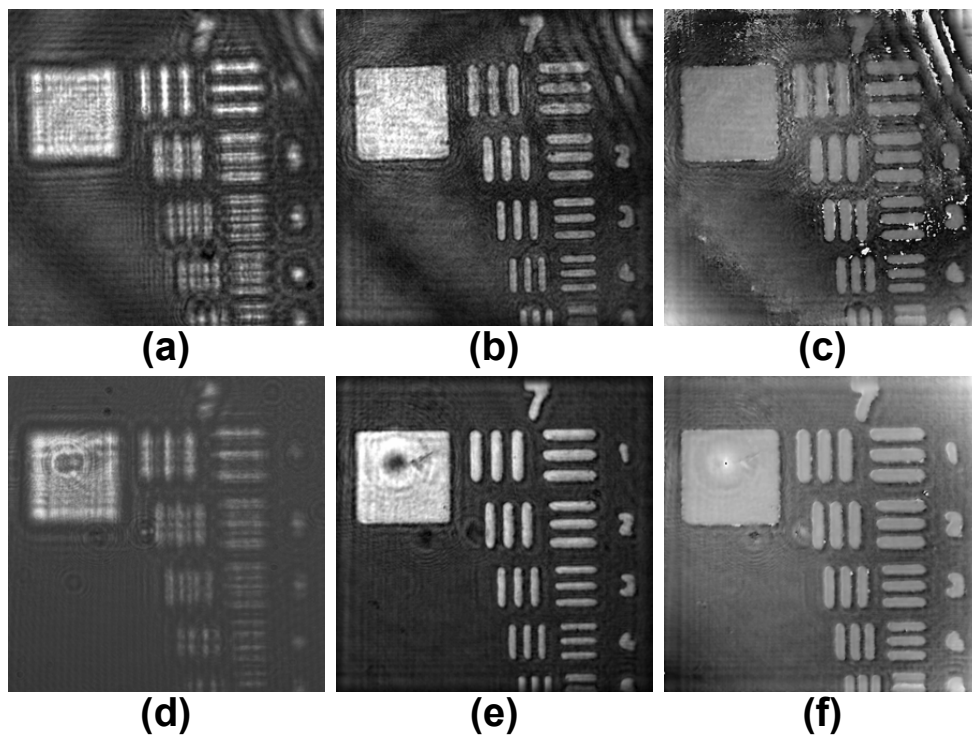


Abbildung 4.19: (a),(d) Hologramm, (b),(e) rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung, (c),(f) Phasenverteilung mod 2π eines mit einem 20x Mikroskopobjektiv ($NA = 0,4$) aufgezeichneten USAF 1951 Test-Charts ohne angepasste Beleuchtung (oben) und mit optimierter Beleuchtung (unten).

Mit einem Aufbau gemäß Abbildung 3.2 werden Hologramme eines transparenten USAF 1951 Test-Charts aufgezeichnet. Die Beleuchtung des Objekts in Auflichtanordnung erfolgt durch das zur Vergrößerung eingesetzte 20x Mikroskopobjektiv ($NA = 0,4$).

In Abbildung 4.19 sind Ergebnisse des Vergleichs mit nicht angepasster und mit optimierter Objektbeleuchtung dargestellt. In der oberen Reihe wird die rekonstruierte räumliche Amplituden- und Phasenverteilung von einem Streifensystem, das

durch Vielfachreflexionen im Mikroskopobjektiv entsteht, überlagert. Die Störungen, die besonders stark in der rechten oberen Ecke auftreten, verursachen Abweichungen der rekonstruierten räumlichen Phasenverteilung $> 2\pi$. Eine quantitative Auswertung der räumlichen Phasenverteilung zur Messung der Topographie des Objekts ist daher nicht möglich. Im Vergleich dazu zeigen die in der unteren Reihe dargestellten Ergebnisse, dass durch Optimierung der Objektbeleuchtung mittels Feinpositionierung der Linse (L2) und der Aperturblende (A) in der in Abbildung 3.2 dargestellten Anordnung Störungen in der rekonstruierten Amplituden- und Phasenverteilung durch Vielfachreflexionen stark reduziert werden können.

4.3.3 Experimentelle Überprüfung des Zusammenhangs zwischen Objektebenenabstand und Rekonstruktionsabstand

Zur experimentellen Überprüfung der in Kapitel 2.5 hergeleiteten Beziehungen zwischen Objektebenenabstand und Rekonstruktionsabstand werden mit einer Anordnung gemäß Abbildung 3.1 Hologramme eines USAF 1951 Test-Charts aufgezeichnet. Exemplarisch werden zur Vergrößerung der Objektweite ein 20x Mikroskopobjektiv ($NA = 0,4$) und ein 40x Mikroskopobjektiv ($NA = 0,6$) eingesetzt.

Zu Beginn der Messung wird das USAF 1951 Test-Chart so vor dem Mikroskopobjektiv positioniert, dass die Gruppenelemente scharf auf den CCD-Sensor abgebildet werden. Danach wird das Objekt mit einer Differentialmikrometerschraube (Positioniergenauigkeit $\sigma_g \approx 1 \mu\text{m}$) entlang der optischen Achse auf das Mikroskopobjektiv zu bewegt: $\Delta g = 0 - 130 \mu\text{m}$. Die Hologrammaufnahme erfolgt in Abständen von $10 \mu\text{m}$. Bei der anschließenden Rekonstruktion mit DFT bzw. NDRM+CVM wird der Rekonstruktionsabstand empirisch variiert, bis die Strukturen des USAF 1951 Test-Charts in der rekonstruierten räumlichen Amplituden- und Phasenverteilung maximal scharf erscheinen. Schließlich werden die Ergebnisse mit den in Kapitel 2.5 hergeleiteten Beziehungen 2.80 und 2.89 verglichen.

Für die Berechnung der theoretischen Kurven muss die Brennweite des verwendeten Mikroskopobjektivs bekannt sein. Laut Hersteller lässt sich f aus der Vergrößerung M mit Gleichung 2.43 berechnen: $f_{20x} = 8,25 \text{ mm}$, $f_{40x} = 4,125 \text{ mm}$ mit dem Fehler $\sigma_f \approx 0,1 \text{ mm}$. Der Quellpunktabstand d wird mit Gleichung 2.88 aus dem Rekonstruktionsparameter K_x bestimmt. Für die mit dem 20x Mikroskopobjektiv durchgeführte Messreihe ergibt sich: $K_x = 1,085 \cdot 10^{-4}$, $d = 0,389 \text{ m}$. Für die mit dem 40x Mikroskopobjektiv durchgeführte Messreihe ergibt sich:

$K_x = 1,153 \cdot 10^{-4}$, $d = 0,176$ m. Dabei beträgt der Fehler aufgrund der Genauigkeit von K_x : $\sigma_d \approx 0,1$ mm (Kapitel 4.2.2).

Bei der Herleitung von Gleichung 2.88 anhand der geometrischen Beziehungen in Abbildung 2.4 wird vorausgesetzt, dass das Objekt mit parallelem Licht beleuchtet wird. In Kapitel 4.3.2 wurde aber gezeigt, dass die Beleuchtung mit einer ebenen Welle aufgrund von Störungen durch parasitäres Streulicht und Vielfachreflexionen nicht optimal ist. Weicht die Objektbeleuchtung von einer ebenen Welle ab, so gilt die Beziehung 2.88 nur näherungsweise, da der Quellpunkt der Objektwelle dann nicht im Brennpunkt des Mikroskopobjektivs liegt.

Aus diesem Grund wird zur Bestimmung des Quellpunktabstands das Objekt einmalig mit einem kollimierten Strahl beleuchtet. Der aus der Wiederholung dieser Messung abgeschätzte Fehler beträgt $\sigma_d \approx 5$ mm. Die Wellenlänge des verwendeten Laserlichts ($\lambda = 532$ nm) und der Pixelabstand des CCD-Sensors ($\Delta x = 6,7$ μ m, $\Delta y = 6,7$ μ m) werden als fehlerfreie Größen angenommen.

Abbildung 4.20 zeigt die für die direkte Rekonstruktion (DFT) und die Rekonstruktion im Ortsraum mit anschließender Propagation der komplexen Objektwelle (NDRM+CVM) bestimmten Rekonstruktionsabstände in Abhängigkeit vom Objektebenenabstand. Zum Vergleich sind die theoretischen Kurven dargestellt, die sich durch Einsetzen der experimentellen Parameter in die Beziehungen 2.80 und 2.89 ergeben.

Zur Quantifizierung des Fehlers der Messung wird auf die Gleichungen 2.80 und 2.89 das Fehlerfortpflanzungsgesetz angewendet (Gleichungen 4.6 und 4.7). Daraus ergeben sich die in Abbildung 4.20 eingezeichneten Fehlerbalken.

$$\begin{aligned} \sigma_z^2 &= \left[\frac{d^2 f^2}{(f^2 - d\Delta g)^2} \right]^2 \sigma_g^2 + \left[\frac{2d^2 f \Delta g}{(f^2 - d\Delta g)^2} \right]^2 \sigma_f^2 \\ &+ \left[\frac{2df\Delta g - d^2 \Delta g^2}{(f^2 - d\Delta g)^2} \right]^2 \sigma_d^2 \end{aligned} \quad (4.6)$$

$$\sigma_{z'}^2 = \left[\frac{d^2}{f^2} \right]^2 \sigma_g^2 + \left[\frac{2d^2 \Delta g}{f^3} \right]^2 \sigma_f^2 + \left[\frac{2d\Delta g}{f^2} \right]^2 \sigma_d^2 \quad (4.7)$$

Fazit: Die experimentellen Ergebnisse zeigen sehr gute Übereinstimmung mit den nach Gleichung 2.80 und 2.89 berechneten Kurven und verifizieren damit die in Kapitel 2.5 hergeleiteten Beziehungen zwischen Objektebenenabstand Δg und Rekonstruktionsabstand z für die direkte Rekonstruktion (z. B. mit DFT) und für die Rekonstruktion in der Hologrammebene mit anschließender Propagation (z. B. mit NDRM+CVM).

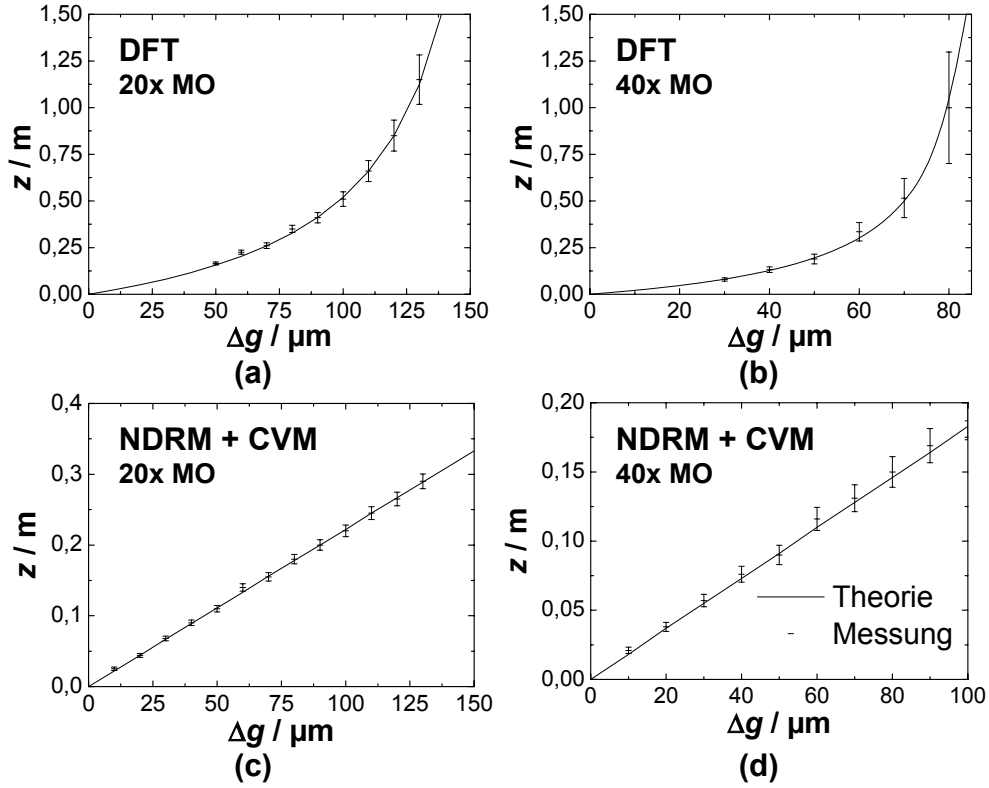


Abbildung 4.20: Rekonstruktionsabstand über Objektverschiebung: direkte Rekonstruktion mit DFT (oben), Rekonstruktion im Ortsraum mit der NDRM und anschließende Propagation der komplexen Objektwelle mit CVM (unten) und Vergleich mit der Theorie (Gleichung 2.80 und 2.89).

Anmerkung: Durch Auflösen der Beziehungen 2.80 und 2.89 nach dem Objektebenenabstand Δg lässt sich jeder im Abstand z rekonstruierten Bildebene eine Objektebene $\Delta g(z)$ zuordnen:

$$\Delta g(z) = \frac{f^2 z}{d^2 + dz} \quad (4.8)$$

$$\Delta g(z') = \left(\frac{2f\lambda K_x}{\Delta x^2 - \lambda^2 K_x} \right)^2 z'. \quad (4.9)$$

(Analog kann in Gleichung 4.9 K_x durch K_y und Δx durch Δy ersetzt werden.)

4.3.4 Laterale Auflösung und Schärfentiefe

Zur Bestimmung der lateralen Auflösung und der Schärfentiefe des digitalholographischen Mikroskops werden mit einem Aufbau gemäß Abbildung 3.1 Holo-

gramme eines negativ USAF 1951 Test-Charts aufgezeichnet. Dabei werden zur Vergrößerung der Objektwelle Mikroskopobjektive mit unterschiedlicher Vergrößerung (5x bis 40x) und numerischer Apertur ($NA = 0,1$ bis $0,6$) eingesetzt. Das Objekt wird bewusst unscharf in die Hologrammebene abgebildet, um zu überprüfen, ob die laterale Auflösung durch die Propagation vermindert wird. Hierbei wird der durch Gleichung 4.8 gegebene Objektabstand Δg so gewählt, dass bei der Rekonstruktion mit der NDRM+CVM ohne Erweiterung der digitalen Hologramme mit Nullen Aliasing-Effekte weitestgehend vermieden werden: $5x \Delta g = 2 \text{ mm}$, $10x \Delta g = 200 \mu\text{m}$, $20x \Delta g = 60 \mu\text{m}$ und $40x \Delta g = 50 \mu\text{m}$.

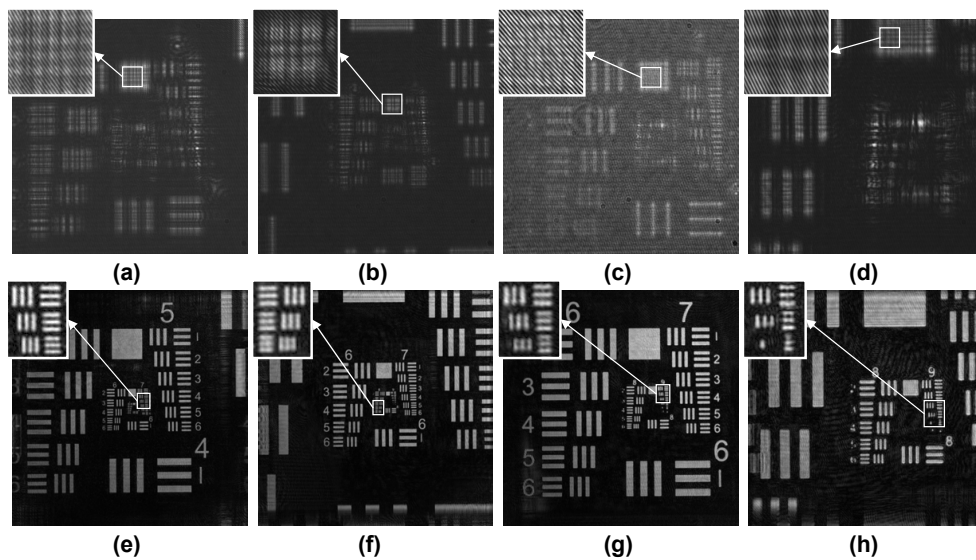


Abbildung 4.21: Mit einem Aufbau gemäß Abbildung 3.1 (Durchlicht) aufgezeichnete Hologramme des negativ USAF 1951 Test-Charts und Ausschnittsvergrößerungen: (a) 5x, (b) 10x, (c) 20x und (d) 40x Mikroskopobjektiv, (e)-(h) zugehörige mit NDRM+CVM rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilungen inkl. Ausschnittsvergrößerungen der kleinsten aufgelösten Gruppen.

In Abbildung 4.21 sind die aufgezeichneten Hologramme (a) bis (d) und die daraus rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilungen (e) bis (h) dargestellt. Die Rekonstruktion wird mit der NDRM und anschließender Propagation mit der CVM durchgeführt. Dabei wird der Rekonstruktionsabstand so gewählt, dass die rekonstruierten Strukturen maximal scharf erscheinen. Zur Visualisierung des durch die „off-axis“ Geometrie erzeugten Trägerstreifenmusters sind jeweils Ausschnittsvergrößerungen der Hologramme dargestellt. Die vergrößerten Ausschnitte der rekonstruierten Bilder zeigen die Elemente der Gruppe des Test-Charts, die gerade noch aufgelöst werden, d. h. voneinander getrennt erscheinen. Die zugehörigen

rigen Strukturbreiten und der Vergleich mit der Theorie nach dem Abbe-Kriterium (Gleichung 2.42) ist in Tabelle 4.4 dargestellt.

Zur Bestimmung der Schärfentiefe werden die jeweils mit den verschiedenen Mikroskopobjektiven aufgezeichneten Hologramme in verschiedenen Abständen rekonstruiert. Empirisch erfolgt dabei die Bestimmung der Abstände, an denen die Elemente der kleinsten aufgelösten Gruppe noch als deutlich voneinander getrennt erkannt werden. Abbildung 4.22 zeigt exemplarisch am Beispiel des mit dem 20x Mikroskopobjektiv aufgezeichneten Hologramms des negativ USAF 1951 Test-Charts fünf rekonstruierte Amplitudenverteilungen mit verschiedenen Rekonstruktionsabständen (Ausschnittsvergrößerung der Gruppen 8 und 9). In Abbildung 4.22 (b) und (d) sind die Elemente der Gruppe 9 gerade noch als getrennte Linien erkennbar. Der Abstand der rekonstruierten Objektebenen zwischen den einzelnen Bildern beträgt $1,82 \mu\text{m}$, so dass sich für den Schärfentiefebereich $z_{\text{DOF}} = 3,6 \mu\text{m} \pm 1,0 \mu\text{m}$ ergibt. Die in den Abbildungen 4.22 (a) und (e) dargestellten räumlichen Amplitudenverteilungen befinden sich deutlich außerhalb des Schärfentiefebereichs, denn die Elemente der Gruppe 9 sind nicht mehr voneinander zu unterscheiden. Die Ergebnisse für alle weiteren untersuchten Mikroskopobjektive sind ebenfalls in Tabelle 4.4 dargestellt.

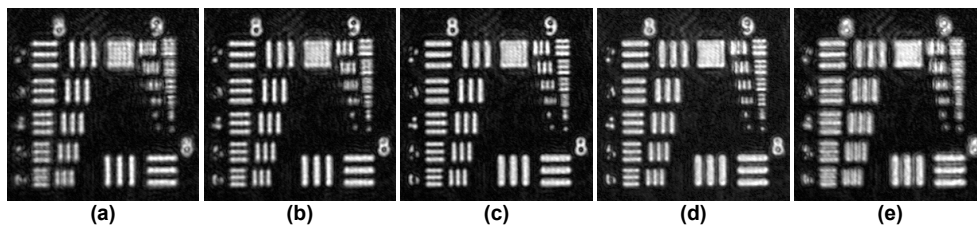


Abbildung 4.22: Rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilungen (histogrammgespreizte Ausschnittsvergrößerungen der Gruppe 8 und 9) des mit einem 20x Mikroskopobjektiv ($\text{NA} = 0,4$) aufgezeichneten Hologramms (Abbildung 4.21 (c)). Der Objektebenenabstand zwischen den Bildern beträgt $1,82 \mu\text{m}$.

Fazit: Die Ergebnisse zeigen, dass die laterale Auflösung und die Schärfentiefe bei der digitalholographischen Mikroskopie wie bei der konventionellen Weißlichtmikroskopie nur durch die optischen Eigenschaften des Systems begrenzt werden [82].

4.3.5 Phasenauflösung

Zur Quantifizierung der Phasenauflösung des digitalholographischen Mikroskops werden Messungen an technischen Objekten durchgeführt. Dabei wird ein 20x

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Vergrößerung	5x	10x	20x	40x
Numerische Apertur (NA)	0,1	0,25	0,4	0,6
Abbe-Kriterium ¹⁾ ($d / \mu\text{m}$)	3,25	1,30	0,81	0,54
Aufgelöste Gruppe	7.3	8.4	9.3	9.5
Linienbreite ($\Delta s / \mu\text{m}$)	3,1	1,4	0,78	0,62
Schärfentiefe ²⁾ ($z_{\text{DOF}} / \mu\text{m}$)	67	11	3,9	1,7
Gemessen ($z_{\text{DOF}} / \mu\text{m}$)	71 ± 5	$9,4 \pm 2,5$	$3,6 \pm 1,0$	$1,7 \pm 0,2$

Tabelle 4.4: Vergleich der bestimmten lateralen Auflösung und Schärfentiefe mit der Theorie: ¹⁾ Gleichung 2.42 und ²⁾ Gleichung 2.44; Wellenlänge des eingesetzten Laserlichts: $\lambda = 532 \text{ nm}$, Pixelabstand des CCD-Sensors: $\Delta x = 4,65 \mu\text{m}$, $\Delta y = 4,65 \mu\text{m}$.

Mikroskopobjektiv (NA = 0,4) zur Vergrößerung der Objektwelle eingesetzt. Zusätzlich wird anhand einer Messung in Auflichtanordnung überprüft, ob durch den Einsatz einer 12 bit CCD-Kamera mit gekühltem Sensor (PCO Sensicam mit PCI-Bilderfassungskarte) gegenüber der preisgünstigeren 8 bit CCD-Kamera (Sony XCD-SX900 mit IEEE1394 Schnittstelle) eine Verbesserung der Phasenauflösung erzielt werden kann. Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können wird die Belichtungszeit beider Kameras auf $\Delta t_{\text{exp}} = 1 \text{ ms}$ eingestellt.

Auflichtanordnung: Mit einem Aufbau gemäß Abbildung 3.2 wird in Auflichtanordnung die Topographie eines reflektiven Objekts vermessen. Das Objekt ist ein Chrom-Substrat auf dem sich in equidistanten Abständen Chrom-Stufen der Größe: $L \times B \times H = 100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m} \times 30 \text{ nm}$ befinden. Die Höhe der Stufen wird von der Firma Carl Zeiss Jena GmbH mit einer Genauigkeit von: $\Delta H = \pm 10 \text{ nm}$ angegeben. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 4.23 dargestellt. Die obere Reihe zeigt die rekonstruierte räumliche Amplituden- und Phasenverteilung des mit der 8 bit CCD-Kamera aufgezeichneten Hologramms, während in der unteren Reihe die entsprechenden Ergebnisse der 12 bit CCD-Kamera dargestellt sind.

Schnitte durch die in den Abbildungen 4.23 (b) und (e) dargestellten rekonstruierten räumlichen Phasenverteilungen sind in Abbildung 4.24 aufgetragen. Zur Quantifizierung des Phasenrauschens werden die Schnitte Tiefpass gefiltert (Kapitel 3.3) und nach Subtraktion von den ungefilterten Schnitten abgezogen und die Standardabweichung berechnet: (a) 8 bit CCD-Kamera: $\sigma_\varphi = 0,068 \text{ rad} \equiv \lambda/92$, (b) 12 bit CCD-Kamera: $\sigma_\varphi = 0,086 \text{ rad} \equiv \lambda/73$.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Verwendung einer 12 bit CCD-Kamera die Phasenauflösung des Systems nicht erhöht wird. Bei dem beschriebenen Expe-

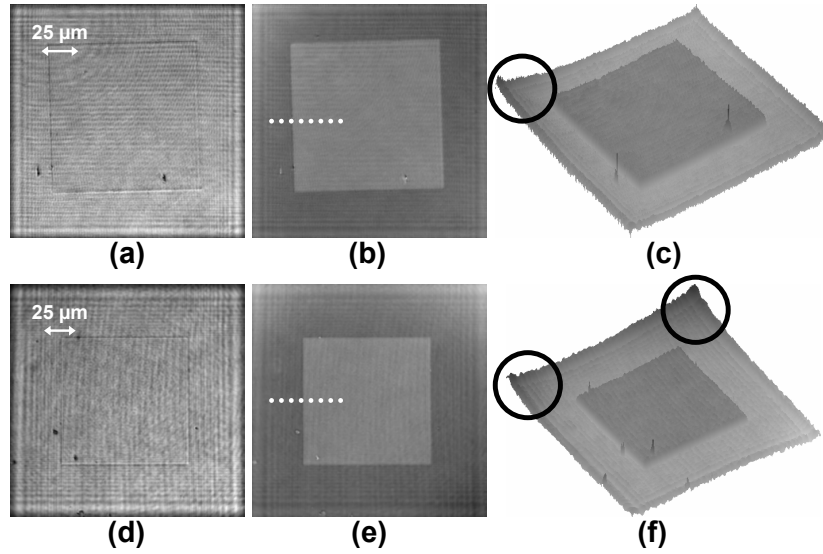


Abbildung 4.23: Ergebnisse der Messung an einer 30 nm Stufe (Chrom auf Chrom) mit einer 8 bit (obere Reihe) und einer 12 bit CCD-Kamera (untere Reihe) mit einem 20x Mikroskopobjektiv ($NA = 0,4$) in Auflichtanordnung: (links) rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung, (Mitte) zugehörige rekonstruierte räumliche Phasenverteilung mod 2π , (rechts) 3D-Darstellung der Phasenverteilung (Kreise markieren „Phasen-Drifts“ der Größe $\Delta\varphi_{\max} \approx 0,7\pi$).

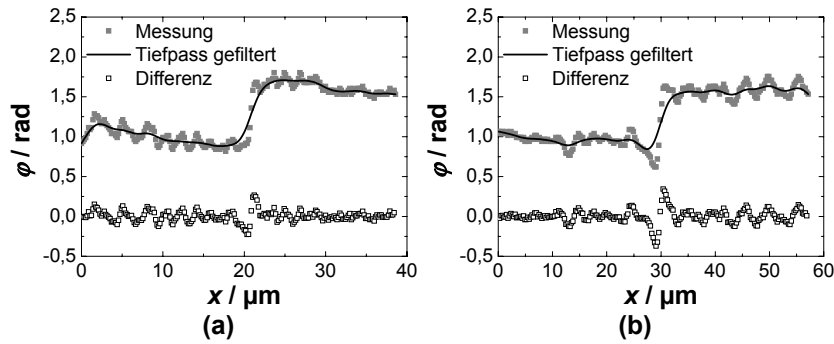


Abbildung 4.24: (a) Schnitt durch die in Abbildung 4.23 (b) dargestellte rekonstruierte räumliche Phasenverteilung entlang der weißen Linie, aufgenommen mit der 8 bit CCD-Kamera, (b) analog Abbildung 4.23 (e), aufgenommen mit der 12 bit CCD-Kamera.

riment ist das Rauschen sogar größer als bei der 8 bit CCD-Kamera. Mit der erzielten Phasenauflösung können bei der verwendeten Wellenlänge ($\lambda = 532 \text{ nm}$) in Luft ($n_M = 1,0$) Höhendifferenzen von $\Delta z_T \geq 3 \text{ nm}$ aufgelöst werden (Gleichung 3.8). Die absolute Genauigkeit, mit der die Topographie eines Objekts über das gesamte Bildfeld vermessen werden kann, wird jedoch durch räumliche „Drifts“ der

Phase beeinflusst. Dieser Effekt hat insbesondere am Rand des Bildfeldes Auswirkungen, wie in den Abbildungen 4.23 (c) und (f) mit schwarzen Kreisen markiert ist. „Phasen-Drifts“ treten immer dann auf, wenn die räumliche Phasenverteilung in der Hologrammebene vom mathematischen Modell 2.63 abweicht. Ursache dafür kann ein nicht bis zum Rand hin gleichmäßig ausgeleuchtetes Bildfeld sein.

Durchlichtanordnung: In einem weiteren Experiment wird mit einem Aufbau gemäß Abbildung 3.1 in Durchlichtanordnung das Hologramm eines reinen Phasenobjektes aufgezeichnet. Das verwendete Richardson Test-Chart der Firma Bio-Microtech Inc. besteht aus einem Quarzglas Substrat, in das verschiedene Strukturen geätzt sind. Die Ergebnisse der Messung sind in Abbildung 4.25 dargestellt.

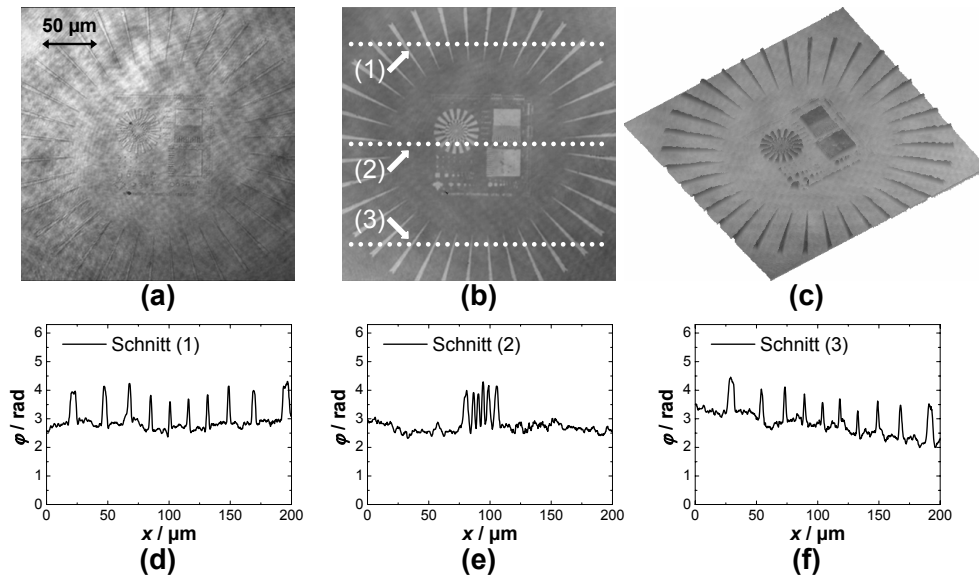


Abbildung 4.25: Ergebnisse von Untersuchungen am Richardson Test-Chart (reines Phasenobjekt) mit einer 8 bit CCD-Kamera, 20x Mikroskopobjektiv ($NA = 0,4$) in Durchlichtanordnung: (a) rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung, (b) zugehörige rekonstruierte räumliche Phasenverteilung mod 2π , (c) Pseudo-3D-Darstellung der Phasenverteilung, (d)-(f) Schnitte entlang der weißen Linien durch die in (b) dargestellte Phasenverteilung.

Zur Quantifizierung der Phasenauflösung werden Schnitte durch die in Abbildung 4.25 (b) dargestellte rekonstruierte räumliche Phasenverteilung gelegt. Die mit der oben beschriebenen Methode bestimmte Standardabweichung beträgt $\sigma_\varphi = 0,055 \text{ rad} \equiv \lambda/114$ („lokale Phasenauflösung“). Auch die Ergebnisse der Messungen in Durchlicht zeigen am Rand des Bildfeldes „Phasen-Drifts“. Besonders groß ist der „Phasen-Drift“ am unteren Rand des in Abbildung 4.25 (f)

dargestellten Bildfeldes: $\Delta\varphi_{\max} \approx 0,5\pi$. Ursache dafür ist die inhomogene Ausleuchtung in diesem Bereich, die in der rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilung (Abbildung 4.25 (a)) deutlich zu erkennen ist.

4.3.6 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse zur Systemcharakterisierung und -optimierung

Die in Kapitel 4.3.1 dargestellten Ergebnisse der Messungen mit unterschiedlichen „off-axis“ Anordnungen zeigen, dass zur Minimierung des Rauschens der rekonstruierten räumlichen Amplituden- und Phasenverteilungen die Seitenbänder im Raumfrequenzspektrum des Hologramms deutlich voneinander getrennt und im Abstand einiger Pixel zum Bildrand positioniert werden müssen. Eine bevorzugte Orientierung der Trägerstreifen kann bei der hier zur Hologrammaufnahme eingesetzten CCD-Kamera (Sony XCD-SX900) nicht nachgewiesen werden, was im Kern die Ergebnisse aus [56, 76] bestätigt.

Die in Kapitel 4.3.2 beschriebenen Ergebnisse demonstrieren, dass der Kontrast der rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilungen in Durchlichtanordnung durch Optimierung der Objektbeleuchtung um ca. 20 % verbessert wird. Des Weiteren wird anhand von rekonstruierten Amplituden- und Phasenverteilungen exemplarisch gezeigt, dass auch in Auflichtanordnung durch Feinjustage der Beleuchtung störende Reflexe, die vor allem im Mikroskopobjektiv auftreten, minimiert werden können.

Die Ergebnisse der in Kapitel 4.3.3 beschriebenen Experimente stimmen mit den in Kapitel 2.5 hergeleiteten Beziehungen zwischen Objektabstand Δg und Rekonstruktionsabstand z überein. Der lineare Zusammenhang zwischen Δg und z bei der Rekonstruktion in der Hologrammebene und anschließender Propagation der komplexen Objektwelle (z. B. mit der NDRM+CVM) erleichtert das experimentelle Arbeiten und die spätere Auswertung, denn der Proportionalitätsfaktor $c := \left(\frac{2f\lambda K_x}{\Delta x^2 - \lambda^2 K_x} \right)^2$ in Gleichung 4.9 kann durch Verschieben eines Objekts mit markanten Strukturen entlang der optischen Achse und Bestimmung der zugehörigen Rekonstruktionsabstände auf einfache Weise ermittelt werden, z. B. durch lineare Regression [77]. Ein besonderer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass keine weiteren Parameter (Brennweite des Mikroskopobjektivs, Pixelabstand des CCD-Sensors, etc.) des experimentellen Aufbaus bekannt sein müssen.

Die mit verschiedenen Mikroskopobjektiven durchgeführten Messungen an einem Auflösungs-Test-Chart zeigen, dass die laterale Auflösung und die Schärfentiefe der rekonstruierten räumlichen Amplitudenverteilungen analog zur Weißlichtmikroskopie nur durch die abbildende Optik begrenzt werden. Die Ergebnisse bestätigen weiterhin, dass die durch den Pixelabstand begrenzte Auflösung von

CCD-Sensoren als holographisches Speichermedium durch den Einsatz von Mikroskopobjektiven zur Vergrößerung der Objektwelle kompensiert wird. Hierzu ist es erforderlich, dass die durch das Mikroskopobjektiv gerade noch aufgelösten Strukturen so auf den CCD-Sensor abgebildet werden, dass das Abtasttheorem nicht verletzt wird. Wenn z. B. bei der Rekonstruktion mit der NDRM die Objektwelle in einem Bereich von mindestens 3×3 Pixeln als konstant angenommen wird (Kapitel 2.4.3) ist zusätzlich eine Überabtastung erforderlich, die durch Anpassen des Abbildungsmaßstabes realisierbar ist (z. B. durch eine weitere Linse). Entsprechendes gilt auch für größere ROIs bei der NDRM. Die weitere optische Vergrößerung ist bei den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Mikroskopobjektiven, CCD-Sensoren und den gewählten ROIs der NDRM nicht notwendig. Anhand von Untersuchungen zur Quantifizierung des Rauschens der rekonstruierten räumlichen Phasenverteilungen wird eine Phasenauflösung des Systems im Bereich $\lambda/70$ bis $\lambda/114$ nachgewiesen („lokale Phasenauflösung“). Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass „Phasen-Drifts“ eine Verschlechterung der Messgenauigkeit über das gesamte rekonstruierte Bildfeld bewirken („globale Phasenauflösung“). Dieser Fehler lässt sich nicht pauschal quantifizieren, da er von der verwendeten Optik, der Homogenität der Objektbeleuchtung und der Größe des betrachteten Bildausschnittes abhängt.

Eine Steigerung der „lokalen Phasenauflösung“ durch die Verwendung einer 12 bit CCD-Kamera mit gekühltem Sensor (PCO Sensicam) gegenüber einer 8 bit CCD-Kamera (Sony XCD-SX900) wird nicht erreicht. Die Begründung dafür ist, dass bei den meisten Kameras eine Erhöhung der Quantisierung des Analog-Digital-Konverters lediglich eine erhöhte Auflösung des Rauschens zur Folge hat. Das effektive Signal-Rausch-Verhältnis wird jedoch nicht gesteigert [94].

Fazit: Das optimierte System zur digitalholographischen Mikroskopie erreicht eine laterale Auflösung ($< 1 \mu\text{m}$), die mit der Hellfeld-Mikroskopie vergleichbar ist. Die Phasenauflösung beträgt $\approx \lambda/100$. Zur Hologrammaufnahme kann eine 8 bit CCD-Kamera mit IEEE1394 Schnittstelle eingesetzt werden, ohne dass Einschränkungen hinsichtlich der Messgenauigkeit auftreten. Dadurch wird eine on-line Visualisierung der rekonstruierten Objektwelle (räumliche Amplituden- und Phasenverteilung) ohne großen Aufwand bei der Programmierung möglich (Anhang A.2). Zusammen mit dem für die mikroskopische Anordnung optimierten Rekonstruktionsalgorithmus NDRM+CVM (Kapitel 4.1) und dem automatisierten Verfahren zum Anpassen der Rekonstruktionsparameter (Kapitel 4.2) sind damit die experimentellen Voraussetzungen für Untersuchungen an biologischen Objekten, insbesondere von lebenden Zellen, geschaffen.

4.4 Anwendung des Verfahrens an biologischen Objekten

In diesem Abschnitt erfolgt die Beschreibung von Untersuchungen an biologischen Objekten, die mit dem optimierten System zur digitalholographischen Mikroskopie durchgeführt werden. Zu Beginn wird überprüft, ob durch die numerische Rekonstruktion von Objektebenen mit verschiedenem Rekonstruktionsabstand die durch das Mikroskopobjektiv begrenzte Schärfentiefe vergrößert werden kann. Im Anschluss erfolgt die Vorstellung einer Methode zur Abschätzung des mittleren Brechungsindex von Zellen in Durchlichtanordnung. Schließlich wird das Verfahren zur Messung von induzierten morphologischen Veränderungen an lebenden Zellen eingesetzt.

4.4.1 Holographisch „erweiterte“ Schärfentiefe

Die Schärfentiefe eines optischen Systems ist durch Gleichung 2.44 gegeben. Durch eine große numerische Apertur der Abbildungsoptik, die für eine hohe laterale Auflösung erforderlich ist, wird die Schärfentiefe jedoch reduziert ($z_{\text{DOF}} \sim \text{NA}^{-2}$). Bei der Untersuchung von Objekten, deren Höhe bzw. Dicke größer als der Schärfentiefebereich ist, erfolgt durch unscharf abgebildete Objektebenen eine Beeinträchtigung der Bildqualität. Die Informationen über unscharf abgebildete Objektebenen gehen dabei verloren bzw. sind von unzureichender Qualität.

Bei der digitalholographischen Mikroskopie werden Amplitude und Phase der Objektwelle gespeichert. Dabei wird durch den Rekonstruktionsabstand z , der als Parameter in die Formel zur numerischen Rekonstruktion eingeht, bestimmt, welche Objektebene scharf rekonstruiert wird. Der Zusammenhang zwischen rekonstruierter Objektebene und Rekonstruktionsabstand wurde in Kapitel 2.5 hergeleitet.

4.4.1.1 Untersuchungen am Beispiel eines Fliegenflügels

Mit einem experimentellen Aufbau gemäß Abbildung 4.35 (Demonstrator Seite 111) wird im Hellfeld (Beleuchtung mit einer Halogenlampe) das vergrößerte Bild des Teils eines Fliegenflügels aufgezeichnet (Abbildung 4.26 (a)). Dabei wird ein 20x Mikroskopobjektiv ($\text{NA} = 0,4$) mit einer Schärfentiefe $z_{\text{DOF}} = 3,9 \mu\text{m}$ (Gleichung 2.44) verwendet. Aufgrund der begrenzten Schärfentiefe ist nur der obere

linke Teil des Fliegenflügels scharf abgebildet. Die Haare am Rand des Flügels im unteren rechten Bildbereich (Ausschnittsvergrößerung) werden unscharf abgebildet und sind deshalb kaum voneinander zu unterscheiden.

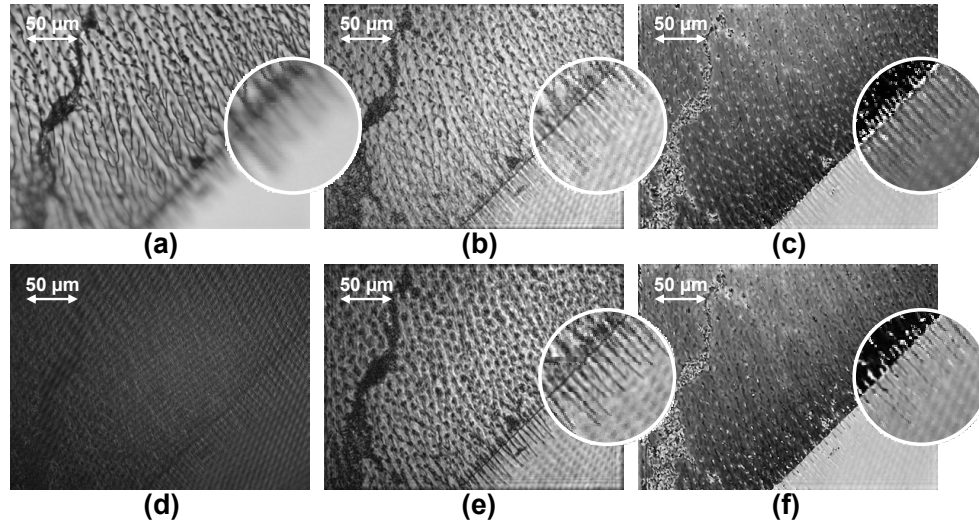


Abbildung 4.26: (a) Hellfeld-Aufnahme des Teils eines Fliegenflügels mit Ausschnittsvergrößerung, (d) digitales Hologramm des Fliegenflügels, (b) rekonstruierte Amplitudenverteilung mit Ausschnittsvergrößerung (gleiche Objektebene wie in (a) scharf abgebildet), (c) Phasenverteilung mod 2π zu (b), (e) im Abstand $\Delta g = 35 \mu\text{m}$ rekonstruierte Objektebene mit Ausschnittsvergrößerung, (f) Phasenverteilung zu (e).

Mit identischer Aufnahmegeometrie wird zusätzlich ein digitales Hologramm (Abbildung 4.26 (d)) der gleichen Bildebene gespeichert. Aus dem Hologramm werden mit der NDRM+CVM verschiedene Bildebenen rekonstruiert („numerischer Fokus“). Abbildung 4.26 (b) zeigt die mit der NDRM in der Hologrammebene ($\Delta g = 0$) rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung und Abbildung 4.26 (e) die im Abstand $\Delta g = 35 \mu\text{m}$ rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung. Die Haare des Fliegenflügels (Ausschnittsvergrößerung) werden jetzt scharf rekonstruiert und sind gut voneinander zu unterscheiden (Vergleich der Abbildungen 4.26 (a) und (b) mit (e)). Die zugehörigen ebenfalls rekonstruierten räumlichen Phasenverteilungen sind in Abbildung 4.26 (c) und (f) dargestellt. Dabei ist der Kontrast der Haare (Ausschnittsvergrößerung) gegenüber der Amplitudenverteilung sehr niedrig.

4.4.1.2 Untersuchungen am Beispiel einer Zwiebelmembran

Einige Mikroskophersteller erweitern die durch das Mikroskopobjektiv begrenzte Schärfentiefe, indem der Fokustrieb des Mikroskops mechanisch (manuell oder automatisiert) wenige Mikrometer vor und zurück bewegt wird. Dabei werden Bilder in verschiedenen Fokuspositionen aufgezeichnet und anschließend mit einer entsprechenden Software zu einem Bild mit erweiterter Schärfentiefe zusammengefügt. Dieses Prinzip lässt sich auf die digitalholographische Mikroskopie übertragen, mit dem Vorteil, dass aus einem einzigen Hologramm verschiedene Objektebenen rekonstruiert werden können („numerischer Fokus“).

Mit einem experimentellen Aufbau gemäß Abbildung 3.1 wird das digitale Hologramm einer Zwiebelmembran in Durchlichtanordnung aufgezeichnet. Die Vergrößerung der Objektweite erfolgt mit einem 20x Mikroskopobjektiv ($NA = 0,4$) mit $3,9 \mu\text{m}$ Schärfentiefe. Anschließend werden verschiedene Objektebenen mit der NDRM+CVM rekonstruiert. Abbildung 4.27 (a) bis (c) zeigt drei jeweils im Abstand von $\Delta g = 10,5 \mu\text{m}$ rekonstruierte Amplitudenverteilungen der Zwiebelmembran. In jeder rekonstruierten Ebene werden dabei spezifische Objektstrukturen scharf abgebildet, während andere Strukturen unscharf erscheinen.

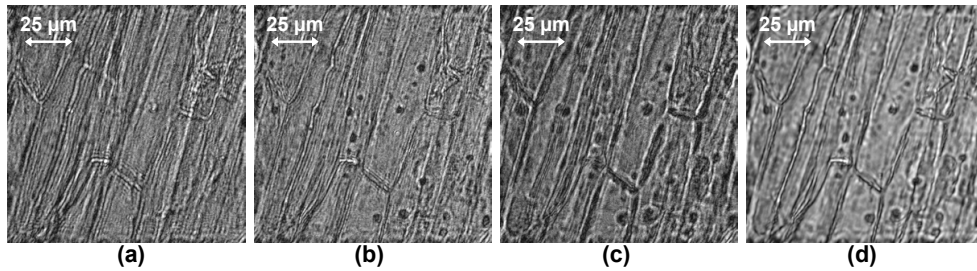


Abbildung 4.27: (a)-(c) In verschiedenen Abständen rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung einer Zwiebelmembran: (a) $z = 0,10 \text{ m}$, $\Delta g = 35,0 \mu\text{m}$, (b) $z = 0,13 \text{ m}$, $\Delta g = 45,5 \mu\text{m}$, (c) $z = 0,16 \text{ m}$, $\Delta g = 56,0 \mu\text{m}$, (d) entsprechend Gleichung 4.10 aufsummierte und anschließend normierte räumliche Amplitudenverteilung über $\Delta g = 35,0 \mu\text{m} - 56,0 \mu\text{m}$; Der Abstand zwischen den aufsummierten Ebenen beträgt $1,0 \mu\text{m}$.

Zur Generierung eines Bildes, in dem alle Strukturen der Zwiebelmembran gleichzeitig scharf erscheinen, werden Objektebenen im Bereich $\pm 10,5 \mu\text{m}$ um die mittlere Fokusposition (Abbildung 4.27 (b)) im Abstand $\Delta g = 1,0 \mu\text{m}$ rekonstruiert, aufsummiert und normiert:

$$E_{\text{erw.}}(x, y) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |\Psi(x, y, z_n)| \quad \text{für alle } x, y. \quad (4.10)$$

Das einfache Aufsummieren der Objektebenen mit Gleichung 4.10 ist nur durch die Rekonstruktion mit der NDRM+CVM möglich, da hier bei der Propagation der Objektweite der Abbildungsmaßstab und die Pixelauflösung konstant bleiben (Kapitel 4.1.3).

Abbildung 4.27 (d) zeigt die rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung der Zwiebelmembran mit holographisch „erweiterter“ Schärfentiefe. Im Gegensatz zu den Bildern (a) bis (c) erscheinen deutlich mehr Strukturen der Zwiebelzelle gleichzeitig scharf. Zusätzlich wird in (d) durch die Aufsummierung von verschiedenen Objektebenen statistisches Rauschen minimiert.

4.4.2 Zellkulturmodell PaTu 8988

Im Rahmen der interdisziplinären Kooperation des Labors für Biophysik mit dem Labor für Gastroenterologische Molekulare Zellbiologie, Medizinische Klinik und Poliklinik B, Universitätsklinikum Münster werden Experimente an humanen Pankreas-Karzinom-Zellen durchgeführt. Die untersuchten Ausgangszelllinien PaTu 8988S und PaTu 8988T wurden 1985 aus derselben Lebermetastase eines Pankreas Adenokarzinoms einer 64-jährigen Patientin isoliert und über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen. Die Zellen der Linie PaTu 8988S wachsen in kompakten Zellverbänden mit intakten Adherens Junctions², sind hoch differenziert und können den Zellverband nicht verlassen. Dagegen wachsen die Zellen der Linie PaTu 8988T ungeordnet in mehreren Zellschichten und können ungehindert migrieren, da sie keine direkten Zell-Zell-Kontakte ausbilden. Diese Zelllinie entspricht einem niedrig differenzierten aggressiven Tumor des Gradings drei [96].

Durch retrovirale Expression³ von E-Cadherin wurden in der Zelllinie PaTu 8988T Zell-Zell-Kontakte an Adherens Junctions rekonstituiert und das Migrationsverhalten dem der hoch differenzierten Zelllinie PaTu 8988S angeglichen [97]. Diese Zelllinie wird mit PaTu 8988T pLXIN E-Cadherin bezeichnet (kurz: PaTu 8988T E-Cad.). Pankreas-Tumor-Zelllinien werden in DMEM mit 5% FCS, 5% Pferdeserum und 2 mM L-Glutamine bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

²Zell-Zell-Adhäsion wird vermittelt über Adherens Junctions, Desmosomen und Tight Junctions. Adherens Junctions werden durch den E-Cadherin/Catenin-Komplex, der an Aktin ankert, geformt [95].

³Viral vermittelter Gentransfer, der es ermöglicht fremdgenetisches Material hocheffizient über den viralen Infektionsmechanismus in eine Zelle zu transduzieren (übertragen) [95].

4.4.3 Abschätzung des Brechungsindex von PaTu 8988 Zellen

Zur Quantifizierung der räumlichen Dickenverteilung in Durchlichtanordnung ist die Kenntnis über die räumliche Verteilung des Brechungsindex einer Zelle notwendig (Kapitel 3.2). Daher werden mit einer experimentellen Anordnung gemäß Abbildung 3.1 Hologramme von Zellen aufgezeichnet, wobei die Besonderheit darin besteht, dass die Zellen zwischen einem Objektträger und einem Deckglas fixiert sind. Eine schematische Darstellung der Probenanordnung zur Bestimmung des mittleren Brechungsindex von Zellen ist in Abbildung 4.28 skizziert.

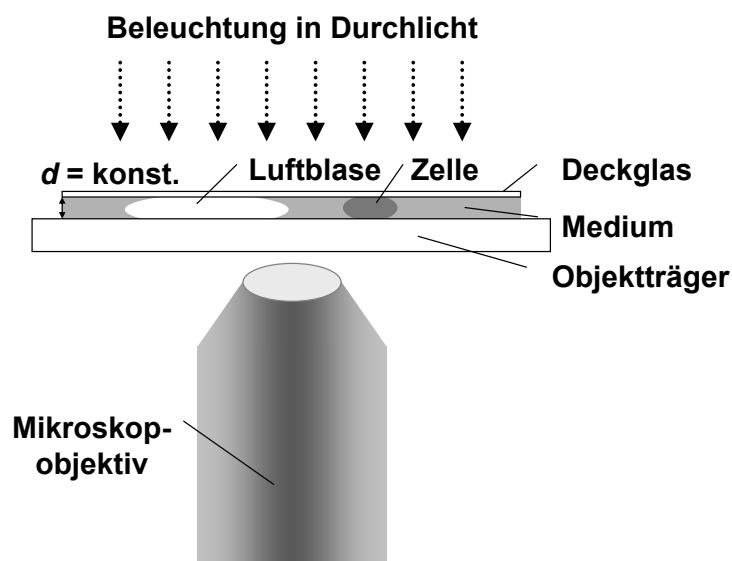


Abbildung 4.28: Prinzip der Messung des mittleren Brechungsindex von Zellen in Durchlichtanordnung. Die Messung wird mit einem Aufbau gemäß Abbildung 3.1 durchgeführt.

Zunächst werden PaTu 8988 Zellen auf einem Objektträger aus Glas, der sich in einer Petrischale mit Nährmedium befindet, kultiviert. Für die Messung wird der Objektträger aus der Petrischale entnommen und ein mit Medium benetztes Deckglas *fest* aufgedrückt, damit die Zellen zwischen Objektträger und Deckglas eingeklemmt werden. Lufteinschlüsse, deren Brechungsindex bekannt ist, dienen als Referenz zur Bestimmung des Brechungsindex der Zellen.

Abbildung 4.29 zeigt exemplarisch Ergebnisse einer an PaTu 8988T Zellen durchgeführten Messung. Der entfaltete Schnitt (Abbildung 4.29 (c)) durch die rekonstruierte räumliche Phasenverteilung (Abbildung 4.29 (b)) zeigt, dass die räumliche Verteilung des in z -Richtung integral gemessenen Brechungsindex der Zelle und der Luftblase in erster Näherung homogen ist. Das Plateau im Be-

reich der Zelle und der Luftblase zeigt, dass zu Objektträger und Deckglas Kontakt besteht.

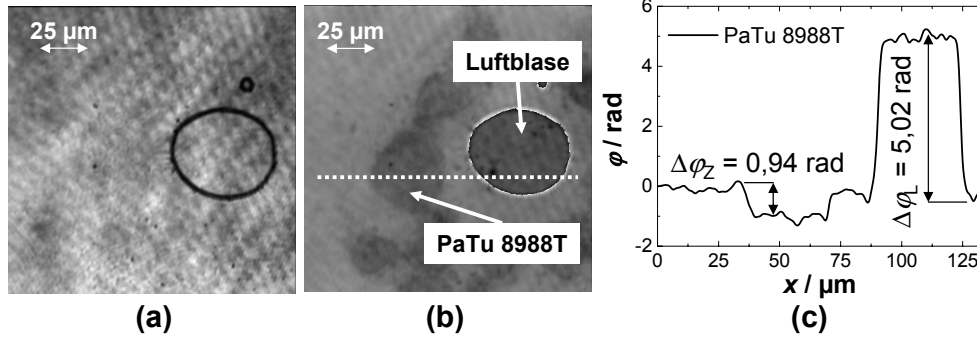


Abbildung 4.29: Messung des Brechungsindex an einer PaTu 8988T Zelle mit der in Abbildung 4.28 dargestellten Anordnung, (a) rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung, (b) zugehörige Phasenverteilung mod 2π , (c) Differenzphase gegenüber dem umgebenden Medium entlang der gestrichelten weißen Linie in (b).

Entsprechend Gleichung 3.7 ist die Dicke der Luftblase und der Zelle gegeben durch:

$$z_L = \frac{\lambda \Delta\phi_L}{2\pi(n_M - n_L)} \quad (4.11)$$

$$\text{und } z_Z = \frac{\lambda \Delta\phi_Z}{2\pi(n_Z - n_M)}. \quad (4.12)$$

Dabei werden der Brechungsindex des Mediums mit n_M , der Brechungsindex von Luft mit n_L , der gesuchte Brechungsindex von PaTu 8988 mit n_Z , die gegenüber dem Nährmedium durch die Luftblase erzeugte Phasendifferenz mit $\Delta\phi_L$, der Abstand zwischen Objektträger und Deckglas im Bereich der Luftblase mit z_L , die gegenüber dem Nährmedium durch die Zelle erzeugte Phasendifferenz mit $\Delta\phi_Z$, der Abstand zwischen Objektträger und Deckglas im Bereich der Zelle mit z_Z und die Wellenlänge des Laserlichts mit λ bezeichnet. Unter der Annahme, dass der Abstand zwischen Objektträger und Deckglas im Bereich einiger $10 \mu\text{m}$ konstant ist, gilt:

$$z_L = z_Z. \quad (4.13)$$

Gleichsetzen der Beziehungen 4.11 und 4.12 und Auflösen nach n_Z ergibt für den integralen Brechungsindex der Zelle:

$$n_Z = \frac{\Delta\phi_Z}{\Delta\phi_L} (n_M - n_L) + n_M. \quad (4.14)$$

Der Brechungsindex des Mediums wird mit einem Abbe-Refraktometer gemessen: $n_M = 1,337 \pm 0,001$, der Brechungsindex von Luft ist aus der Literatur [49] bekannt: $n_L = 1,000$. Weiterhin werden die Phasendifferenzen im Bereich der Zelle und der Luftblase anhand des entfalteten Schnittes in Abbildung 4.29 (c) bestimmt: $\Delta\phi_Z = 0,94 \text{ rad} \pm 0,25 \text{ rad}$ und $\Delta\phi_L = 5,02 \text{ rad} \pm 0,25 \text{ rad}$. Einsetzen der Messgrößen in Gleichung 4.14 ergibt für den mittleren Brechungsindex der PaTu 8988T Zelle: $n_Z = 1,40 \pm 0,016$.

Der Abstand zwischen Objektträger und Deckglas wird durch Einsetzen in Gleichung 4.11 bzw. 4.12 ($d \equiv z_L = z_Z$) bestimmt: $d = 1,26 \text{ } \mu\text{m} \pm 0,063 \text{ } \mu\text{m}$. Bei den für n_Z und d angegebenen Fehlern (Anwendung des Fehlerfortpflanzungsgesetzes auf Gleichung 4.11 und 4.14) werden nur die Fehler der Größen $\Delta\phi_L$ und $\Delta\phi_Z$ mit der größten Messunsicherheit berücksichtigt.

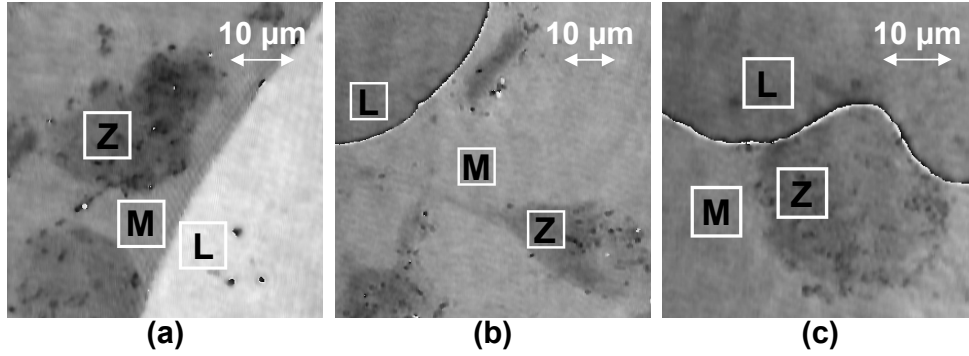


Abbildung 4.30: Rekonstruierte räumliche Phasenverteilungen mod 2π zur Abschätzung des integralen Brechungsindex von (a) PaTu 8988S, $n_Z = 1,39 \pm 0,023$, (b) PaTu 8988T, $n_Z = 1,38 \pm 0,023$ und (c) PaTu 8988T E-Cad., $n_Z = 1,38 \pm 0,026$.

Um die Messunsicherheit der Einzelmessung zu quantifizieren werden mit der gleichen Anordnung Hologramme von je vier verschiedenen Zellen der Zelllinien PaTu 8988S, PaTu 8988T und PaTu 8988T E-Cad. aufgezeichnet und rekonstruiert. Entsprechend der in Abbildung 4.30 eingezeichneten Markierungen werden der mittlere Phasenwert und dessen Standardabweichung im Bereich der Zelle (Z), der Luftblase (L) und des umgebenden Mediums (M) bestimmt und daraus die Phasendifferenzen $\Delta\phi_L$ und $\Delta\phi_Z$ berechnet. Dabei wird der Phasensprung um 2π am Rand der Luftblasen berücksichtigt.

Exemplarisch sind in Abbildung 4.30 Ergebnisse von Messungen an Zellen der Zelllinien PaTu 8988S, PaTu 8988T und PaTu 8988T E-Cad. dargestellt. Innerhalb der Messunsicherheit unterscheidet sich der mittlere Brechungsindex der verschiedenen Zelllinien nicht. Als Ensemblemittel über alle Messungen ergibt sich für den mittleren Brechungsindex von PaTu 8988: $\overline{n_Z} = 1,38 \pm 0,015$.

4.4.4 Untersuchung morphologischer Veränderungen von PaTu 8988T Zellen durch Expression von E-Cadherin

Ziel der in diesem Abschnitt beschriebenen Untersuchungen ist es, Messungen, die mit einem Raster-Elektronen-Mikroskop (Typ: LEO1530 VP mit Everhart Thornley Sekundärelektronendetektor, Hochvakuum Mode: $p = 10^{-6}$ mbar, Beschleunigungsspannung: $U = 5$ kV) an PaTu 8988T und PaTu 8988T E-Cad. Zellen durchgeführt wurden, zu referenzieren. Die REM-Aufnahmen der Zellen geben Grund zu der Annahme, dass die retrovirale Expression von E-Cadherin in PaTu 8988T morphologische Veränderungen zur Folge hat, da die PaTu 8988T E-Cad. Zellen gegenüber dem unveränderten Wildtyp PaTu 8988T deutlich flacher erscheinen. Allerdings kann auch die aufwendige Präparation der Proben für Untersuchungen am REM als Ursache für das Abflachen der Zellen nicht ausgeschlossen werden. Denn für die Messung im Hochvakuum werden die Zellen auf einem Silizium-Wafer fixiert und getrocknet. Anschließend wird eine dünne Metall- und Karbonschicht aufgedampft [45].

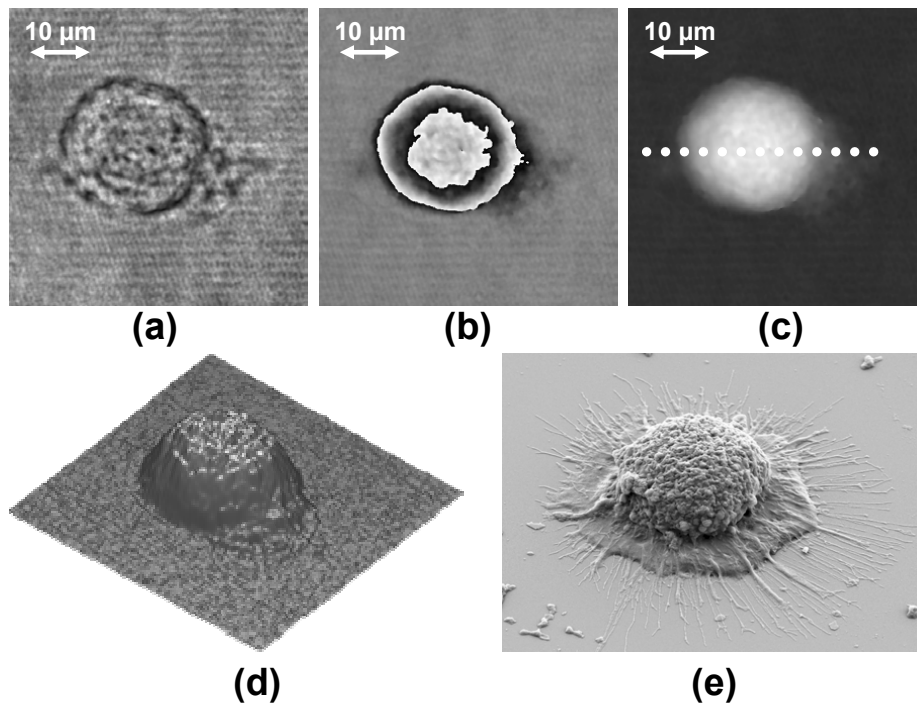


Abbildung 4.31: (a) Rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung von PaTu 8988T, (b) zugehörige räumliche Phasenverteilung mod 2π , (c) entfaltete räumliche Phasenverteilung, (d) Pseudo-3D-Darstellung der entfalteten Phasenverteilung, (e) REM Aufnahme einer präparierten PaTu 8988T Zelle.

Zur Vorbereitung der Messung werden zunächst Zellen der Zelllinien PaTu 8988T und PaTu 8988T E-Cad. in separaten Petrischalen kultiviert. Anschließend werden mit einer experimentellen Anordnung gemäß Abbildung 4.36 Hologramme der Zellen aufgezeichnet und mit der NDRM+CVM rekonstruiert. Abbildung 4.31 zeigt exemplarisch Ergebnisse einer PaTu 8988T Zelle und Abbildung 4.32 Ergebnisse von PaTu 8988T E-Cad. Zellen.

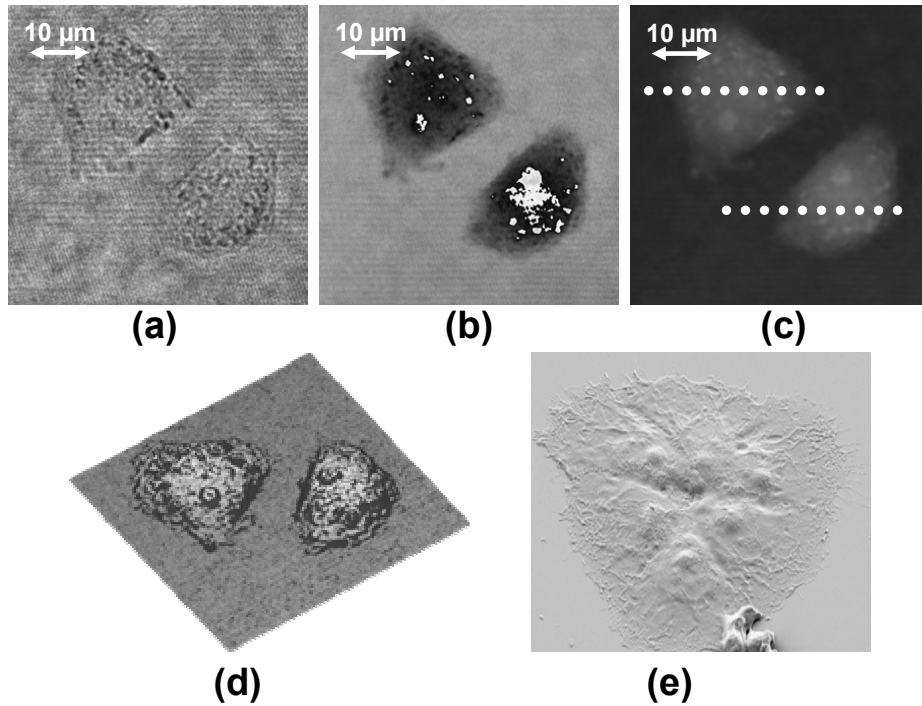


Abbildung 4.32: (a) Rekonstruierte räumliche Amplitudenverteilung von PaTu 8988T E-Cad., (b) zugehörige räumliche Phasenverteilung mod 2π , (c) entfaltete räumliche Phasenverteilung, (d) Pseudo-3D-Darstellung der entfalteten Phasenverteilung, (e) REM Aufnahme von präparierten PaTu 8988T E-Cad. Zellen.

Anschließend werden Schnitte durch die entfalteten räumlichen Phasenverteilungen in Abbildung 4.31 (c) und 4.32 (c) gelegt. Durch Einsetzen der Phasenwerte und des mittleren Brechungsindex von PaTu 8988 (Kapitel 4.4.3) in Gleichung 4.12 wird aus der durch die Zellen gegenüber dem umgebenden Medium erzeugten Phasendifferenz die Höhe der Zellen bestimmt. Der Vergleich der in Abbildung 4.33 aufgetragenen Schnitte bestätigt die zuvor am REM durchgeführten in vitro Messungen. Die Zellen der Zelllinie PaTu 8988T E-Cad. sind deutlich flacher ($z \lesssim 7 - 8 \mu\text{m}$) als die des Wildtyps PaTu 8988T ($z \lesssim 25 \mu\text{m}$).

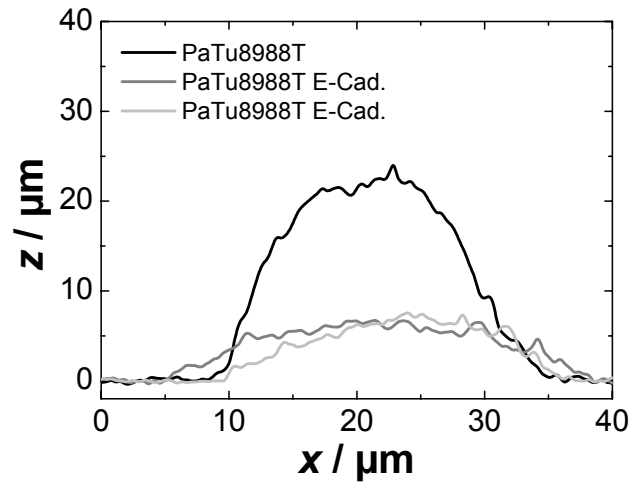


Abbildung 4.33: Schnitte durch die Phasenverteilungen in Abbildung 4.31 (c) und Abbildung 4.32 (c), mit Gleichung 4.12 und dem mittleren Brechungsindex von PaTu 8988 in eine Dickenverteilung umgerechnet.

4.4.5 Dynamische Verformungsmessung an PaTu 8988S Zellen

Das dynamische Verhalten einer Einzelzelle der Linie PaTu 8988S auf die Zugabe des marinen Zellgifts Latrunculin B⁴ soll untersucht werden. Dazu werden mit dem in Abbildung 4.35 dargestellten inversen digitalholographischen Mikroskop Hologramme einer PaTu 8988S Einzelzelle aufgezeichnet (Bildwiederholrate: $\Delta T = 10$ s).

Zu Beginn der Messung ($t = 0$) werden 10 μ l Latrunculin B in die Petrischale pipetiert. Die Substanz bewirkt eine Zerstörung der Actin-Filamente des Zytoskeletts der Zelle. Das dadurch induzierte „Einstürzen“ der Zelle wird anhand der mit der NDRM+CVM rekonstruierten räumlichen Phasenverteilungen sichtbar. Exemplarisch sind in Abbildung 4.34 (obere Reihe) Phasenverteilungen der Zelle zu den Zeitpunkten $t = 0$, $t = 30$ s, $t = 1 : 20$ min und $t = 3 : 00$ min dargestellt. Um die Verformung der Zelle zu quantifizieren werden Schnitte in Höhe der weißen Pfeile durch die Phasenverteilungen gelegt und entfaltet. Anschließend wird die räumliche Phasenverteilung mit Gleichung 4.12 und dem mittleren Brechungsindex von PaTu 8988 (Kapitel 4.4.3) in eine räumliche Dickenverteilung umgerechnet (Abbildung 4.34 (untere Reihe)).

Die Ergebnisse zeigen, dass mit dem System zur digitalholographischen Mi-

⁴Latrunculin B (lat. *Latrunculia magnifica*) ist ein marines Zellgift, das die Actin Polymerisation blockiert und den Aufbau von Mikrofilamenten unterbricht [98, 99].

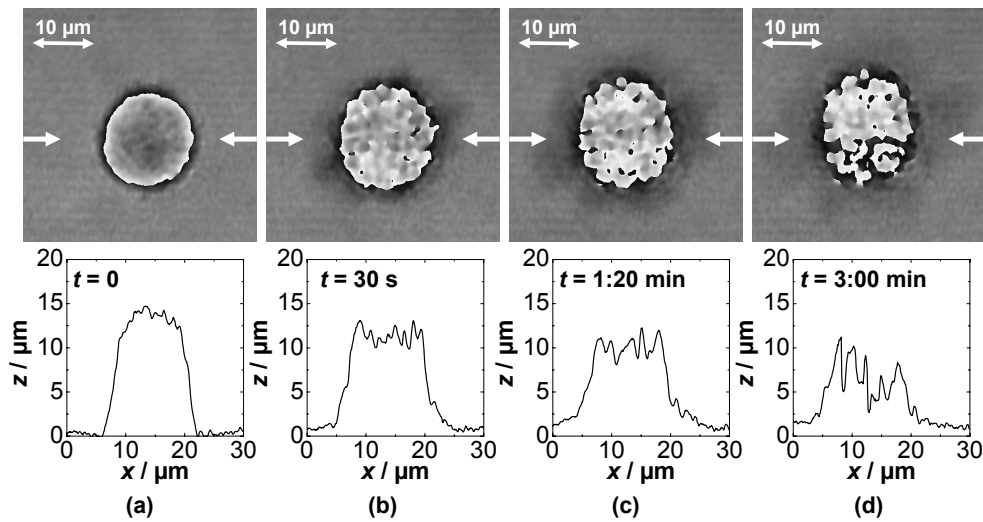


Abbildung 4.34: (oben) Rekonstruierte räumliche Phasenverteilungen mod 2π einer PaTu 8988S Einzelzelle nach Zugabe von Latrunculin B zu den Zeitpunkten: (a) $t = 0$, (b) $t = 30$ s, (c) $t = 1 : 20$ min, (d) $t = 3 : 00$ min, (unten) räumliche Dickenverteilung entlang der horizontalen Schnitte in Höhe der weißen Pfeile.

kroskopie auch dynamische morphologische Veränderungen an lebenden Zellen quantifiziert werden können.

4.4.6 Diskussion der Ergebnisse an biologischen Proben

Die Einsatzfähigkeit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und optimierten Methoden zur digitalholographisch mikroskopischen Untersuchung biologischer Proben, insbesondere lebender Zellen, wird durch die in Kapitel 4.4.1 bis 4.4.5 dargestellten Ergebnisse demonstriert.

In Kapitel 4.4.1 wird gezeigt, dass aus einem Hologramm verschiedene Objektebenen rekonstruiert werden können. Dieser Vorteil gegenüber „konventionellen“ Mikroskopieverfahren ermöglicht zum einen numerisch nachzufokussieren. Am Beispiel eines Fliegenflügels wird gezeigt, dass dazu nur eine Aufnahme des Objekts, das digitale Hologramm, erforderlich ist. Zum anderen besteht die Möglichkeit die durch das Mikroskopobjektiv begrenzte Schärfentiefe durch die Addition verschiedener Objektebenen zu erweitern, was am Beispiel einer Zwiebelmembran demonstriert wird. Besonders hervorzuheben ist dabei, dass die digitalholographische Fokuspachführung keine zusätzlichen mechanischen Komponenten benötigt und nachträglich durchgeführt werden kann. Nachteile gegenüber der Hellfeldmikroskopie sind die durch die kohärente Beleuchtung geminderte Bild-

qualität und der Verlust der Farbinformation des Objekts durch die monochromatische Beleuchtung. Dafür liefert die simultan rekonstruierte räumliche Phasenverteilung der Objektwelle zusätzlich ein sehr kontrastreiches Bild transparenter Objekte, das ohne großen Rechenaufwand quantitativ ausgewertet werden kann.

Für die Bestimmung der räumlichen Dickenverteilung eines in Durchlichtanordnung untersuchten (teil-) transparenten Objekts ist die Kenntnis des integralen Brechungsindex erforderlich. In Kapitel 4.4.3 wird am Beispiel von Pankreas-Karzinom-Zellen demonstriert, dass mit der im Rahmen dieser Arbeit angepassten Probenanordnung der mittlere Brechungsindex von Zellen abgeschätzt werden kann. Der besondere „Trick“ dieser Messung besteht darin, dass Lufteinschlüsse, deren Brechungsindex bekannt ist, als Referenzobjekt verwendet werden. Für die vermessenen PaTu 8988 Zellen ergibt sich, dass die räumliche Verteilung des Brechungsindex in guter Näherung als homogen angenommen werden kann. Der mittlere Brechungsindex beträgt $\bar{n}_Z = 1,38 \pm 0,015$. Dieses Ergebnis stimmt mit dem in [100] gemessenen Wert für den mittleren Brechungsindex von Zellen, der abhängig von der Anzahl der in der Zelle vorhandenen Mitochondrien⁵ zwischen 1,38 und 1,40 liegt, überein.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse der in Kapitel 4.4.4 und 4.4.5 beschriebenen Experimente an verschiedenen lebenden PaTu 8988 Zellen, dass mit der digitalholographischen Mikroskopie quantitative Aussagen über die Form (Unterschied zwischen PaTu 8988T und PaTu 8988T E-Cad.) und dynamische Formveränderungen (chemisch induzierte Zerstörung des Zytoskeletts einer PaTu 8988S Zelle mit Latrunculin B) möglich sind. Bei der Auswertung der Messungen wird vorausgesetzt, dass die Verformungen der Zelle deutlich größer sind als Änderungen der räumlichen Verteilung des Brechungsindex. Dieser wird in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der in Kapitel 4.4.3 beschriebenen Messungen in erster Näherung als konstant und homogen verteilt angenommen.

Es sei an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen, dass bei der Interpretation der rekonstruierten räumlichen Phasenverteilungen von in Durchlichtanordnung aufgezeichneten Hologrammen zu beachten ist, dass die relativ zum umgebenden Medium gemessenen Phasendifferenzen das Produkt aus Dicke und Brechungsindex des Objekts repräsentieren.

Fazit: Der entscheidende Vorteil der digitalholographischen Mikroskopie besteht darin, dass die Messungen berührungslos, minimal invasiv, markerfrei, ohne Scannen und mit hoher zeitlicher Auflösung an lebenden Zellen durchgeführt werden können.

⁵Mitochondrien werden auch als „Kraftwerke“ der Zelle bezeichnet. In ihnen wird beim Abbau von Glukose unter Abgabe von CO₂ und Verbrauch von O₂ (Zellatmung) ATP synthetisiert [101].

4.5 Aufgebaute Demonstratorsysteme

Auf der Basis der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten in Zusammenarbeit mit der Firma P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried und der Firma Carl Zeiss Jena GmbH Demonstratoren zur digitalholographischen Mikroskopie realisiert werden. Dabei bilden die in Kapitel 3.1 ausführlich beschriebenen experimentellen Aufbauten zur digitalholographischen Mikroskopie in Durchlicht- und Auflichtanordnung die Grundlage der in den Abbildungen 4.35 und 4.36 dargestellten Anordnungen.

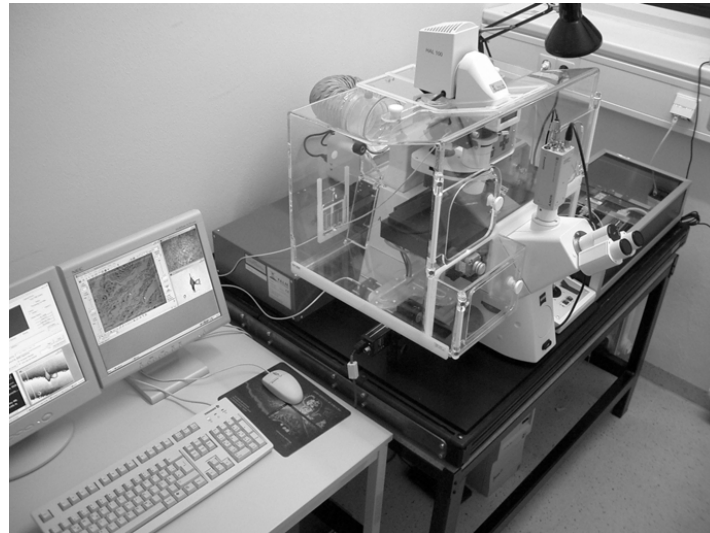
Ausführungsbeispiel 1: Die Basis des in Zusammenarbeit mit der Firma P.A.L.M. entwickelten Demonstrators bildet das in Abbildung 4.35 (a) dargestellte P.A.L.M. Microbeam. Dabei handelt es sich um ein inverses Mikroskop (Zeiss Axiovert 200), in das zum Manipulieren, Ausschneiden und Katapultieren von Zellen ein UV-Laser über den Fluoreszenz-Port des Systems eingekoppelt ist. Zur Durchführung von Langzeitmessungen bei vorgegebener Temperatur ist der Objektisch von einem Inkubator aus Plexiglas umgeben. Mit einer daran angeschlossenen Heizung inkl. Temperaturregelung sind z. B. Langzeituntersuchungen an lebenden Zellen bei einer konstanten Temperatur von 37 °C möglich. Um die ursprüngliche Funktionalität des bestehenden Systems (Hellfeld, UV-Laser) nicht zu beeinträchtigen werden die Komponenten für die digitale Holographie als Glasfaser basiertes modulares System adaptiert.

Abbildung 4.35 (b) zeigt schematisch vereinfacht den prinzipiellen experimentellen Aufbau zur digitalen Holographie, der in das Mikroskop integriert ist. Dabei wird analog zu den in Kapitel 3.1 beschriebenen Aufbauten das von einem Laser emittierte Licht mit einem Strahlteilerwürfel in Objekt- und Referenzwelle aufgeteilt. Um ein flexibles Einstellen des Intensitätsverhältnisses zwischen Objekt- und Referenzwelle zu ermöglichen wird ein polarisierender Strahlteilerwürfel in Kombination mit einer Halbwellenplatte verwendet. Die Gesamtintensität wird mit einem Polarisator reguliert. Anschließend werden Objekt- und Referenzwelle in polarisationserhaltende Single-Mode-Glasfasern eingekoppelt. Dabei wird die Polarisationsrichtung mit Hilfe von zwei zusätzlichen Halbwellenplatten parallel zu einer der Hauptachsen der polarisationserhaltenden Fasern eingestellt. Um die Funktionalität der Hellfeldbeleuchtung mit der Halogenlampe zu erhalten erfolgt die Objektbeleuchtung über einen polarisierenden Strahlteilerwürfel. Durch Drehen der Glasfaser wird die Polarisation der Objektwelle so ausgerichtet, dass ein Maximum an Intensität des Laserlichts in den Kondensor abgelenkt wird. Die Integration des eigentlichen Interferometers erfolgt am zweiten Kameraport des Systems. Die dafür entwickelte kompakte modulare Einheit besteht

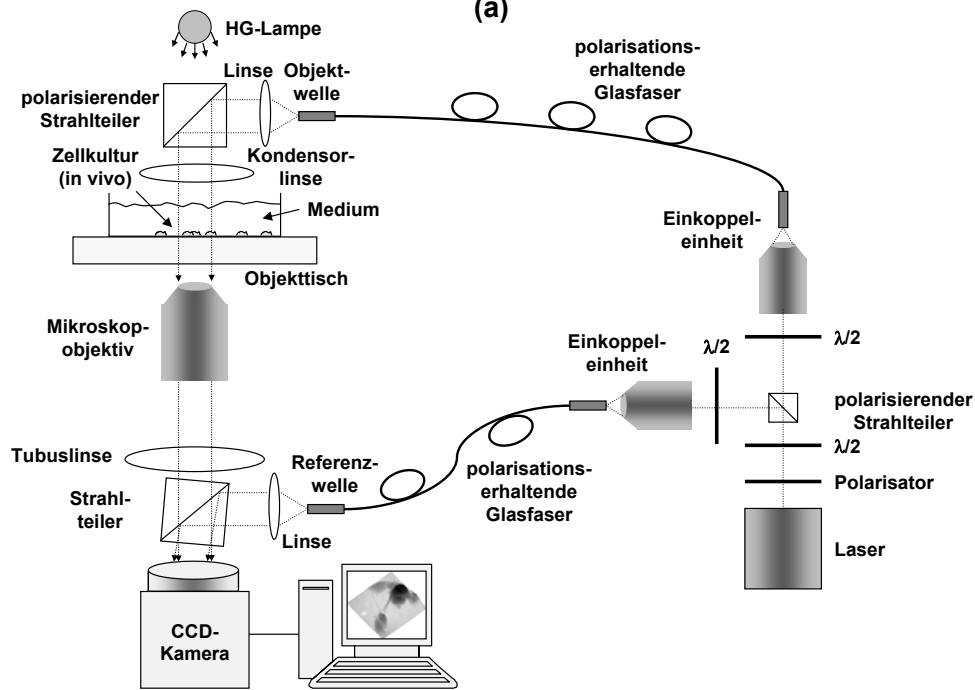
aus einer polarisationserhaltenden Glasfaser für die Referenzwelle, einer Linse, mit der die Referenzwelle kollimiert wird, einem Strahlteilerwürfel zur Realisierung der „off-axis“ Anordnung und einer CCD-Kamera zur Hologrammaufnahme. Anschließend werden die aufgezeichneten digitalen Hologramme über eine IEEE1394 Schnittstelle digital an den zur Steuerung des P.A.L.M. Microbeam eingesetzten Computer übertragen und auf dessen Festplatte gespeichert. Zusätzlich besteht die Möglichkeit digitale Hologramme mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Software on-line zu rekonstruieren und auf dem Computermonitor darzustellen (Anhang A.2).

Ausführungsbeispiel 2: Die Basis des zweiten in Abbildung 4.36 dargestellten Demonstrators, der in Zusammenarbeit mit der Firma Zeiss entwickelt wurde, bildet das Zeiss Axioplan 2 Fluoreszenz-Mikroskop. Im Gegensatz zum P.A.L.M. Microbeam handelt es sich dabei um eine aufrecht stehende (nicht inverse) Anordnung. Zusätzlich zur Durchlichtanordnung ist hier eine Auflichtanordnung zur digitalholographischen Mikroskopie integriert. Die ursprüngliche Funktionalität des Systems (Hellfeld und Fluoreszenz) bleibt analog zum P.A.L.M. Microbeam erhalten. Abbildung 4.36 (b) zeigt den schematischen Aufbau der modularen Komponenten für die Durchlichtanordnung. Prinzipiell entspricht der Aufbau der in Abbildung 4.35 (b) dargestellten Anordnung für das inverse Mikroskop. Die Zuführung der Objekt- und Referenzwelle (nicht abgebildet) erfolgt ebenfalls über polarisationserhaltende Single-Mode-Glasfasern (Abbildung 4.35 (b)). Die in Abbildung 4.36 (c) schematisch dargestellte Auflichtanordnung, bei der das Objekt durch das zur Vergrößerung der Objektwelle eingesetzte Mikroskopobjektiv beleuchtet wird, entspricht in ihrer Funktionalität dem in Abbildung 3.2 dargestellten experimentellen Aufbau.

Für eine detaillierte Beschreibung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Software wird auf den Anhang A.2 verwiesen.



(a)

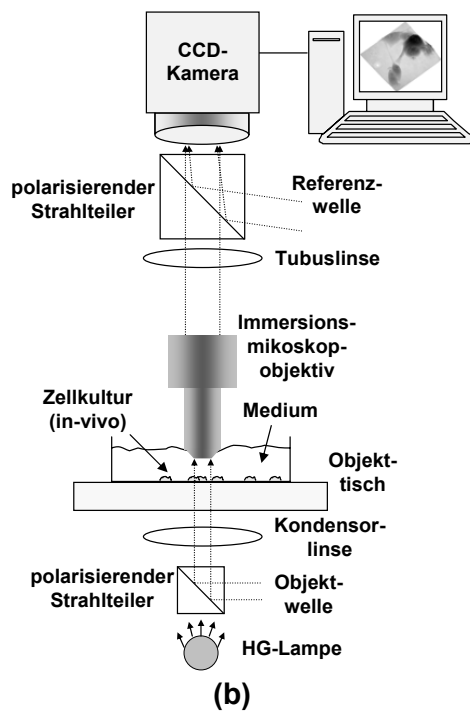


(b)

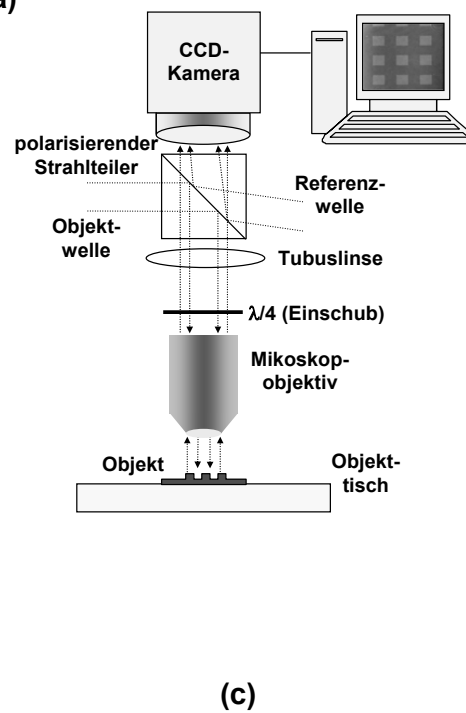
Abbildung 4.35: (a) P.A.L.M. Microbeam mit modularem digitalholographischen System, (b) schematischer Aufbau des adaptierten Glasfaser basierten modularen Systems zur digitalholographischen Mikroskopie in Durchlichtanordnung (links) mit Beleuchtungseinheit, bestehend aus Laser, Strahlauftung und Glasfasereinkopplung (rechts).



(a)



(b)



(c)

Abbildung 4.36: (a) Zeiss Axioplan 2 Fluoreszenz-Mikroskopie-System, schematischer Aufbau des modularen Systems zur digitalholographischen Mikroskopie: (a) Durchlichtanordnung, (b) Auflichtanordnung (Glasfaser basierte Beleuchtungseinheit nicht abgebildet, s. Abbildung 4.35).

5 Einordnung des Verfahrens, Schlussfolgerungen und Ausblick

Erstmalig wurde ein Hologramm durch den Einsatz eines Computers (Modell Minsk 22) von P. Yaroslavskii et al. [102] im Jahre 1971 rekonstruiert. Die numerische Rekonstruktion des auf 6 bit quantisierten 512×512 Elemente großen digitalen Hologramms mit diskreter Fouriertransformation dauerte sechs Stunden. Die Entwicklungen in der Halbleiter-Industrie, insbesondere der letzten zehn Jahre, führten zu großem Fortschritt bei der Verbesserung von CCD-Sensoren, die erstmals im Jahre 1994 von U. Schnars et al. [11] zur direkten Aufnahme digitaler Hologramme eingesetzt wurden. Da die Ortsauflösung moderner CCD-Sensoren von derzeit ca. $5 \mu\text{m}$ noch immer um Größenordnungen geringer als bei photographischen Materialien ist, muss die Objektwelle für mikroskopische Anwendungen durch ein abbildendes System vergrößert werden. E. Cuche et al. [13] konnte im Jahre 1999 durch den Einsatz eines Mikroskopobjektivs zeigen, dass damit die laterale Auflösung bei der digitalen Holographie bis hin zur Beugungsbegrenzung gesteigert werden kann. Weiterhin ermöglichte die Entwicklung immer leistungsfähigerer Computer gleichzeitig eine stetige Verbesserung der digitalen Bildverarbeitung. Eine diskrete schnelle Fouriertransformation (FFT) eines auf 16 bit quantisierten Arrays mit 512×512 Elementen wird derzeit von einem handelsüblichen Computer (Kosten $< 500 \text{ €}$) in weniger als 0,5 s durchgeführt. Diese technischen Voraussetzungen bilden die Grundlage für eine gezielte Weiterentwicklung der Algorithmen für die numerische Rekonstruktion von digitalen Hologrammen. So wurden u. a. effiziente Methoden zur Unterdrückung der nullten Beugungsordnung und des „Twin-Image“ entwickelt [19, 80, 81, 103]. Methoden zur Beschreibung der räumlichen Phasenverteilung der Referenzwelle durch mathematische Modelle ermöglichen weiterhin die gleichzeitige Rekonstruktion der räumlichen Amplituden- und Phasenverteilung der Objektwelle aus einem einzigen Hologramm [16, 29, 59, 82], wodurch die Anwendung der digitalen Holographie als quantitatives Phasenkontrastverfahren besonders in der Mikroskopie praktikabel wird.

Einen eleganten Ansatz zur Rekonstruktion der komplexen Objektwelle (Am-

plitude und Phase) ohne die störenden Terme: nullte Beugungsordnung und „Twin-Image“, der mit der Berechnung der räumlichen Phasenverteilung bei der ESPI (engl. „Electronic Speckle Pattern Interferometry“) mit räumlichem Phasenschieben vergleichbar ist, wurde von Liebling et al. [16, 29] im Jahre 2002 vorgestellt. Dabei wird die im Ortsraum mit der NDRM (engl. „Non-Diffractive Reconstruction Method“) rekonstruierte komplexe Objektwellenfront in einem zweiten Schritt mit der diskreten Fresneltransformation (DFT) propagiert. Durch die Verbindung von Bildebenenholographie mit der numerischen Auswertung des Beugungsintegrals wird die Rekonstruktion multipler Bildebenen ermöglicht. Bei der Ausführung der DFT besteht ein Problem darin, dass die rekonstruierte Objektwelle unterhalb eines Mindestrekonstruktionsabstandes, der typischerweise einige Zentimeter beträgt, von Aliasing-Effekten überlagert wird [82]. Erste Untersuchungen zur ESPI mit räumlichem Phasenschieben wurden von Pedrini et. al. [30, 31] durchgeführt und von Bothe et al. [33], Burke et al. [34, 35] und Kemper et al. [37] insbesondere zur Rekonstruktion der Phaseninformation weiterentwickelt und optimiert. Der Vorteil der NDRM gegenüber den Algorithmen zum räumlichen Phasenschieben besteht darin, dass Objekt- und Referenzwelle beliebig geformt sein können (planar, sphärisch, etc.), sofern die durch die Überlagerung von Objekt- und Referenzwelle generierte räumliche Phasenverteilung in der Hologrammebene durch ein mathematisches Modell beschrieben werden kann. Die Anwendbarkeit der digitalholographischen Mikroskopie als (quantitatives) Phasenkontrastverfahren zur Untersuchung von biologischen Proben wurde u. a. in [14, 15, 16, 20, 65] gezeigt.

Im Rahmen dieser Arbeit werden verschiedene Algorithmen zur „off-axis“ Rekonstruktion der Objektwelle bei der digitalholographischen Mikroskopie quantitativ verglichen. Die besten Ergebnisse werden durch die Kombination der Methode zur Rekonstruktion im Ortsraum (NDRM) und der anschließenden Propagation mit der Faltungsmethode (CVM) erzielt, die in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben wird. Erst durch die Kombination der Methoden wird die Rekonstruktion der komplexen Objektwelle ohne nullte Beugungsordnung und „Twin-Image“ mit voller Pixelauflösung bei gleichzeitig konstant bleibendem Abbildungsmaßstab und ohne die Überlagerung von Aliasing-Effekten bei kleinen Rekonstruktionsabständen ermöglicht (Kapitel 4.1). Da für die Rekonstruktion der komplexen Objektwelle in der Hologrammebene das Anpassen eines mathematischen Modells der räumlichen Phasenverteilung in der Hologrammebene erforderlich ist, wird hierfür ein automatisiertes Verfahren entwickelt (Kapitel 3.5) und dessen Genauigkeit anhand von Simulationen und experimentellen Daten quantifiziert (Kapitel 4.2). Dieses Verfahren ist für den praktischen Einsatz der Messmethode, insbesondere bei Langzeituntersuchungen an biologischen Proben, von zentraler Bedeutung, da nur auf diese Weise große Datenmengen mit endlichem Zeitaufwand

und reproduzierbarer Genauigkeit ausgewertet werden können. Die Untersuchungen zur Optimierung der „off-axis“ Geometrie zeigen, dass optimale Ergebnisse erzielt werden, sofern „Image“ und „Twin-Image“ im Raumfrequenzspektrum des digitalen Hologramms deutlich voneinander (keine Raumfrequenzanteile um Null) und vom Rand des Spektrums (kein Unterabtasten) getrennt positioniert werden, d. h. es sind keine besonderen technischen Anforderungen für die Justage des Winkels zwischen Objekt- und Referenzwelle erforderlich (Kapitel 4.3.1). Weitere Untersuchungen zeigen, dass eine optimale Einstellung der kohärenten Objektbeleuchtung sowohl in Durchlicht- als auch in Auflichtanordnung zur Minimierung von parasitärem Streulicht und Vielfachreflexionen, die vor allem im Mikroskopobjektiv auftreten, erforderlich ist. Demzufolge müssen an die Justage der Objektbeleuchtung bei der digitalholographischen Mikroskopie höhere technische Anforderungen als z. B. bei der Weißlichtmikroskopie gestellt werden (Kapitel 4.3.2). Die erstmalig im Rahmen dieser Arbeit für verschiedene Rekonstruktionsmethoden beschriebene Herleitung und Überprüfung des experimentellen Zusammenhangs zwischen Objektebenenabstand und Rekonstruktionsabstand ist für das experimentelle Arbeiten und die quantitative Auswertung der Ergebnisse sehr wichtig, da auf diese Weise jeder rekonstruierten Bildebene eindeutig eine Objektebene zugeordnet werden kann (Kapitel 2.5 und 4.3.3) [82]. Mit dem optimierten Gesamtsystem durchgeführte Messungen an technischen Objekten belegen, dass die laterale Auflösung und die Schärfentiefe der rekonstruierten Objektwelle nur durch Beugung begrenzt wird und demnach mit der Weißlichtmikroskopie vergleichbar ist (Kapitel 4.3.4). Zusätzlich wird eine Phasenauflösung im Bereich $\lambda/70$ bis $\lambda/114$ nachgewiesen, die auch durch den Einsatz einer 8 bit CCD-Kamera gegenüber einer 12 bit CCD-Kamera mit gekühltem Sensor nicht gemindert wird (Kapitel 4.3.5). Durch die Verwendung einer handelsüblichen 8 bit CCD-Kamera mit IEEE1394 Schnittstelle, die keine zusätzliche Bilderfassungskarte benötigt, können die Kosten des Systems ohne Minderung der Messgenauigkeit erheblich reduziert werden.

Erst die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Weiterentwicklung und Optimierung der numerischen Methoden zur digitalholographischen Rekonstruktion und die Optimierung des experimentellen Aufbaus ermöglicht die praktikable Anwendung des Verfahrens an biologischen Objekten (Kapitel 4.4). Durch die Rekonstruktion multipler Objektebenen wird das beim Einsatz eines optischen Systems mit großer numerischer Apertur häufig auftretende Problem einer zu geringen Schärfentiefe minimiert. Am Beispiel der rekonstruierten Ausschnitte eines Fliegenflügels und einer Zwiebelmembran wird der besondere Vorteil für die praktische Anwendung durch den Einsatz der NDRM in Kombination mit der CVM demonstriert: keine Überlagerung durch die nullte Beugungsordnung und das „Twin-Image“, volle Pixelauflösung, konstanter Abbildungsmaßstab und

keine Überlagerung durch Aliasing-Effekte bei kleinen Rekonstruktionsabständen (Kapitel 4.4.1). Besonders bei der Untersuchung von lebenden Zellen in Suspension ist das Anpassen der Rekonstruktionsparameter für jedes einzelne Hologramm erforderlich, da die rekonstruierten Phasenverteilungen ansonsten von störenden Streifenmustern überlagert werden, die eine quantitative Auswertung verhindern (Kapitel 4.2.3). Mit Hilfe des automatisierten Verfahrens zum Anpassen der Rekonstruktionsparameter ist die schnelle Rekonstruktion großer Datenmengen mit reproduzierbarer Messgenauigkeit möglich (Kapitel 4.4.3 bis 4.4.5). Bei der quantitativen Auswertung von Messungen an transparenten Objekten in Durchlichtanordnung, z. B. bei lebenden Zellen, muss berücksichtigt werden, dass die rekonstruierte Phasenverteilung des Objekts dessen integralen Brechungsindex repräsentiert. Das in Kapitel 4.4.3 beschriebene Verfahren zur Bestimmung des mittleren Brechungsindex von Zellen ermöglicht die Abschätzung einer räumlichen Dickenverteilung anhand von in Durchlichtanordnung durchgeführten Messungen. Damit können morphologische Unterschiede und dynamische Verformungen lebender Zellen quantifiziert werden (Kapitel 4.4.4 und 4.4.5).

Zusammengefasst ermöglicht das im Rahmen dieser Arbeit optimierte und charakterisierte System zur digitalholographischen Mikroskopie Messungen an lebenden biologischen Objekten, insbesondere an lebenden Zellen, die gleichzeitig berührungslos, markerfrei, ohne Scannen und mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung durchgeführt werden können. Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wurden in enger Zusammenarbeit mit industriellen Projektpartnern Demonstratoren realisiert, die zeigen, dass das Messverfahren in professionelle Mikroskopiesysteme integriert werden kann ohne deren ursprüngliche Funktionalität zu beeinflussen. Damit besteht die Möglichkeit bereits verbreitete Mikroskopieverfahren mit der digitalen Holographie zu kombinieren, was für die Etablierung des Verfahrens in Biologie und Medizin wichtig ist.

Für die Zukunft ist eine weitere Optimierung der kohärenten Auflichtbeleuchtung bzgl. der am Mikroskopobjektiv auftretenden Vielfachreflexionen wünschenswert. Durch die Verwendung von speziell angepassten Mikroskopobjektiven, die beidseitig antireflexbeschichtet sind, würden Vielfachreflexionen minimiert werden und bei Mikroskopobjektiven mit einem separaten Beleuchtungskanal u. U. gar nicht mehr auftreten. Ebenfalls denkbar ist der Einsatz einer kurzkohärenten Lichtquelle zur Vermeidung von störenden Interferenzeffekten aufgrund von Vielfachreflexionen und eine tiefenselektive Unterdrückung von Streulicht. Weiterhin ist die Erhöhung der lateralen Auflösung, z. B. bei der dynamischen Untersuchung der Ausbildung von Filopodien und Lamellopodien¹ bei der Zell-

¹Filopodien und Lamellopodien sind dynamische Strukturen, die für die Bewegung von Zellen notwendig sind. Sie besitzen die Form fädiger Fortsätze und manchmal auch lamellenartiger Erhebungen [101].

migration, von besonderem Interesse. Zum einen kann dies durch die Verwendung von Mikroskopobjektiven mit möglichst hoher numerischer Apertur und zum anderen durch den Einsatz kohärenter Lichtquellen mit möglichst kurzer Wellenlänge, z. B. im ultravioletten Spektralbereich, erreicht werden. Außerdem erscheint zur Etablierung der digitalholographischen Mikroskopie als markerfreies nicht scannendes Messverfahren für dynamische Untersuchungen zellulärer Lebensvorgänge besonders die Klärung spezifischer zellbiologischer Fragestellungen, insbesondere in Kombination mit der Fluoreszenzmikroskopie, vielversprechend.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist der Aufbau und die Optimierung eines mikroskopischen Messsystems für die digitale Holographie, das insbesondere für Untersuchungen an lebenden Zellen eingesetzt werden soll. Die Topographiemessung reflektiver technischer Objekte ist ebenfalls wünschenswert. Hierfür werden experimentelle Aufbauten zur digitalen „off-axis“ Holographie in Durchlicht- und Auflichtanordnung realisiert. Die erforderliche mikroskopische Auflösung wird durch den Einsatz von Standard-Mikroskopobjektiven erreicht, mit denen die Objektwelle vergrößert wird.

Einen Schwerpunkt dieser Arbeit bildet der Vergleich verschiedener Algorithmen zur Rekonstruktion digitaler „off-axis“ Hologramme. Das Ergebnis ist, dass die Kombination der NDRM (engl. „Non-Diffractive Reconstruction Method“) und der CVM (engl. „Convolution Method“) zur Rekonstruktion der komplexen Objektwelle für die mikroskopische Anordnung am besten geeignet ist. Erst die Kombination dieser Methoden ermöglicht die Rekonstruktion der räumlichen Amplituden- und Phasenverteilung der Objektwelle ohne nullte Beugungsordnung und „Twin-Image“ mit voller Pixelauflösung bei gleichzeitig konstant bleibendem Abbildungsmaßstab und ohne die Überlagerung von Aliasing-Effekten bei kleinen Rekonstruktionsabständen. Für die Rekonstruktion der komplexen Objektwelle mit der NDRM ist das Anpassen eines mathematischen Modells der räumlichen Phasenverteilung in der Hologrammebene erforderlich. Das hierfür entwickelte automatisierte Verfahren liefert reproduzierbare Ergebnisse, was anhand von Simulationen und experimentellen Daten verifiziert wird und für den praktischen Einsatz des Verfahrens besondere Vorteile hat.

Die Optimierung des experimentellen Aufbaus erfolgt hinsichtlich der holographischen „off-axis“ Geometrie und der Objektbeleuchtung in Durchlicht- und Auflichtanordnung. Die anschließende Charakterisierung des Gesamtsystems ergibt bei der Verwendung von Laserlicht der Wellenlänge $\lambda = 532 \text{ nm}$ und einem 40x Mikroskopobjektiv ($\text{NA} = 0,6$) eine laterale Auflösung von $0,62 \mu\text{m}$, die mit der normalen Hellfeld-Mikroskopie vergleichbar ist. Anhand von statistischem Rauschen wird eine Phasenauflösung im Bereich $\lambda/70$ bis $\lambda/114$ nachgewiesen. Damit kann in Auflichtanordnung an reflektiven Objekten mit glatter Oberfläche (kein Specklerauschen) die Topologie mit $2,3 \text{ nm}$ Auflösung gemessen werden. Es

wird weiterhin gezeigt, dass die Auflösung durch den Einsatz einer kostengünstigen 8 bit CCD-Kamera mit IEEE1394 Schnittstelle, die keine zusätzliche Bilderfassungskarte benötigt, im Vergleich zu einer 12 bit CCD-Kamera mit gekühltem Sensor nicht reduziert wird. Der mathematische Zusammenhang zwischen der im Abstand z rekonstruierten Bildebene und dem Objektebenenabstand Δg wird für die untersuchten Rekonstruktionsmethoden hergeleitet und experimentell überprüft. Die Kenntnis dieses Zusammenhangs erleichtert das experimentelle Arbeiten (Positionierung der Probe, Justage des Aufbaus) und macht die quantitative Bestimmung des Abstandes von Objektstrukturen in z -Richtung möglich.

Im Anschluss erfolgt eine Evaluierung der Anwendungsmöglichkeiten des optimierten Systems zur digitalholographischen Mikroskopie an biologischen Proben. Es wird untersucht, ob durch die Rekonstruktion multipler Objektebenen das beim Einsatz eines optischen Systems mit großer numerischer Apertur häufig auftretende Problem einer zu geringen Schärfentiefe minimiert werden kann. Die Ergebnisse am Beispiel der Ausschnitte eines Fliegenflügels und einer Zwiebelmembran zeigen, dass die Schärfentiefe entweder durch numerisches Fokussieren verschiedener Objektebenen und deren einzelne Darstellung oder durch Addition eines sog. z -Stapels von rekonstruierten Objektebenen deutlich erweitert werden kann. Weiterhin erfolgen Untersuchungen an humanen Pankreas-Karzinom-Zellen des Typs PaTu 8988. Es wird demonstriert, wie mit einem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Verfahren der mittlere Brechungsindex von Zellen in holographischer Durchlichtanordnung abgeschätzt werden kann. Damit ist die Angabe einer räumlichen Dickenverteilung der Probe anhand der rekonstruierten räumlichen Phasenverteilung möglich. Der Vergleich von lebenden Zellen des Typs PaTu 8988T und des retroviral veränderten Typs PaTu 8988T pLXIN E-Cadherin zeigt, dass die Zellen des retroviral veränderten Typs deutlich flacher als die Zellen des unveränderten Wildtyps sind. Das bestätigt zuvor am Raster-Elektronen-Mikroskop durchgeführte Messungen an präparierten Zellen. Weiterhin wird am Beispiel der chemisch induzierten Zerstörung der Aktinfilamente einer lebenden PaTu 8988S Einzelzelle demonstriert, dass mit dem Messverfahren berührungslos und markerfrei dynamische Veränderungen der Zellmorphologie quantifizierbar und dokumentierbar sind.

Schließlich werden auf der Grundlage der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen und in enger Zusammenarbeit mit industriellen Projektpartnern zwei Demonstratoren zur digitalholographischen Mikroskopie aufgebaut. Die Umsetzung erfolgt dabei durch die Integration modularer Komponenten in bereits bestehende kommerzielle Mikroskopiesysteme, ohne dass deren ursprüngliche Funktionalität beeinflusst wird.

A Anhang

A.1 Technische Daten

Laser

Zur Durchführung der experimentellen Arbeiten wird im Rahmen dieser Arbeit ein frequenzverdopelter diodengepumpter Festkörperlaser des Typs 315M-100 der Firma Coherent eingesetzt. Technische Daten:

Kristall	Nd:YAG
Wellenlänge	532 nm (frequenzverdoppelt)
max. Ausgangsleistung	100 mW
Moden	TEM ₀₀ single frequency
Strahl Rundheitsabweichung	< 1,1 : 1,0
Rauschen (10 Hz bis 1 GHz)	< 0,25 % rms
Polarisation	100:1 vertikal
Leistungsaufnahme	< 150 W (40 W normal)
Kühlung	Kühlkörper, Lüfter

Quelle: Herstellerangaben

CCD-Kamera

Kamera	PCO Sensicam	Sony XCD-SX900
Sonsortyp	CCD	CCD
Verstärkungsbereich	-	0 dB bis 18 dB
Bildfrequenz	max. 8 Hz	7,5 Hz oder 3,75 Hz ¹⁾
Leistungsaufnahme	-	3,0 W
Kühlung	2 Stufen Peltier Kühlung und Lüfter	keine
Schnittstelle	BNC an PCI-Framegrabberkarte	IEEE1394
A/D Konverter	12 Bit	8 Bit
Sensorbauform	Interline progressive scan	Interline progressive scan
Mikrolinsen	ja	-
Sensorformat	2/3 Zoll	1/2 Zoll
Pixelanzahl	-	1392 × 1040 ²⁾
eff. Pixelanzahl	Super VGA (1280 × 1024)	SXGA (1280 × 960) ³⁾
Pixelabstand h × v	6,7 μm × 6,7 μm	4,65 μm × 4,65 μm ⁴⁾
Shutter	-	elektr. 1/20000 s bis 2 s
Full Well Capacity	25000 e ⁻	-

Tabelle A.1: Spezifikationen der verwendeten CCD-Kameras; Abweichungen der Sony XCD-X700 gegenüber der Sony XCD-SX900: ¹⁾ 15 Hz oder 7,5 Hz, ²⁾ 1034 × 779, ³⁾ XGA (1024 × 768), ⁴⁾ 6,25 μm × 6,25 μm, Quelle: Herstellerangaben.

Mikroskopobjektive

Hersteller u. Bezeichnung	MZ	NA	ZB / mm	AA / mm	DK / mm
Newport	5x	0,1	160	13,0	-
Newport	10x	0,25	160	5,5	-
Newport	20x	0,4	160	1,7	-
Zeiss LD Acroplan	20x	0,4	∞	8,0	0 - 1,5
Zeiss Wasser Acroplan	20x	0,5	∞	2,0	-
Zeiss LD Acroplan	40x	0,6	∞	1,8	0 - 2,0
Zeiss Wasser Acroplan	40x	0,8	∞	3,6	-
Linos	63x	0,85	160	0,39	0,17

Tabelle A.2: Spezifikation der verwendeten Mikroskopobjektive, MZ: Maßstabszahl, NA: Numerische Apertur, ZB: Zwischenbild, AA: Arbeitsabstand, DK: Deckglaskorrektur, Quelle: Herstellerangaben.

Test-Charts

Im Rahmen dieser Arbeit werden zur Charakterisierung des Messverfahrens die im Folgenden aufgelisteten Test-Charts eingesetzt:

- USAF 1951 Test-Chart der Firma Newport GmbH, Größe: $50 \times 50 \times 1,5$ mm, Chrom auf Glas-Substrat, als positiv Ausführung (Abbildung A.1 (a)) und negativ Ausführung (Abbildung A.1 (b)) erhältlich, Linienbreiten der Gruppenelemente in Tabelle A.3 angegeben;
- Richardson Test-Chart der Firma Bio-Microtech Inc., Quarz Substrat $10 \times 10 \times 0,525$ mm, Strukturen mit einem Gesamtdurchmesser von $270 \mu\text{m}$ geätzt (Abbildung A.2);
- Reflektierende Höhenstufe, Chrom auf Chrom, der Firma Carl Zeiss Jena GmbH, Höhe der Stufen $h = 30 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ (Herstellerangabe).

ANHANG

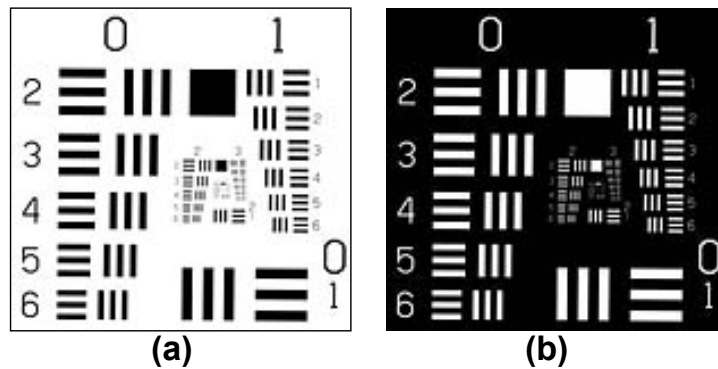


Abbildung A.1: USAF 1951 Test-Chart (a) transparentes Test-Chart, (b) zugehöriges negativ Test-Chart, Quelle: Herstellerangaben.

Element	Gruppe									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9	2,0	0,98
2	446	223	111	55,7	27,9	13,9	7,0	3,5	1,7	0,87
3	397	198	99,2	49,5	24,8	12,4	6,2	3,1	1,5	0,78
4	355	176	88,3	44,2	22,1	11,0	5,5	2,8	1,4	0,69
5	314	157	78,7	39,4	20,0	9,8	4,9	2,5	1,2	0,62
6	281	140	70,1	35,0	17,5	8,8	4,4	2,2	1,1	0,55

Tabelle A.3: Linienbreiten der Gruppenelemente des USAF 1951 Test-Charts, Angaben in μm , Gruppe 8 u. 9 enthält nur das negativ Test-Chart, Quelle: Herstellerangaben.

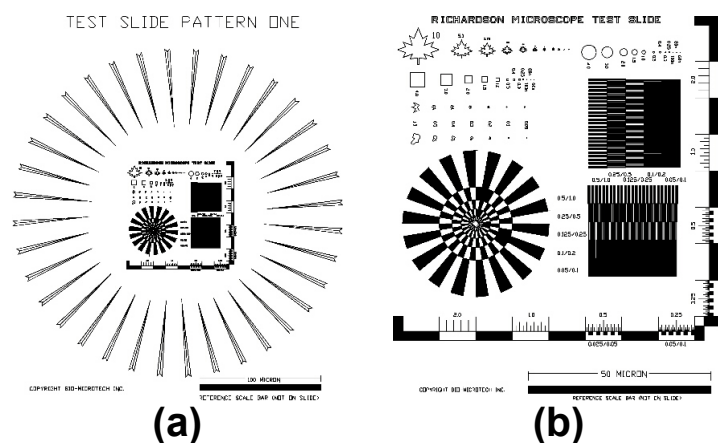


Abbildung A.2: Richardson Test-Chart der Firma Bio-Microtech Inc., Quelle: Herstellerangaben.

A.2 Beschreibung der Software

In diesem Abschnitt wird die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und angewendete Software beschrieben.

Numerische Rekonstruktion der Objektwelle

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Software zur digitalholographischen Rekonstruktion wurde in der auf die Kalkulation mit Matrizen optimierten Entwicklungsumgebung PV-WAVE 8.0 der Firma Visual Numerics Inc. implementiert. Im Folgenden sind die in das Programm REK.PRO integrierten Funktionen aufgelistet:

(i) Implementierte Schnittstellen:

- Laden von Bildern (digitalen Hologrammen) von der Festplatte des Computers im BMP-, TIF- und B16-Format,
- Einfügen von Bildern (digitalen Hologrammen) aus der Zwischenablage von Microsoft Windows zur Kommunikation mit der „Imaging-Software“ für die CCD-Kameras mit IEEE1394 Schnittstelle.

(ii) Automatisiertes Anpassen der Rekonstruktionsparameter:

- Automatisierte Bestimmung von Näherungswerten der Rekonstruktionsparameter aus dem Raumfrequenzspektrum des digitalen Hologramms (Kapitel 3.5.1),
- Automatisierte Optimierung der Rekonstruktionsparameter durch Anpassen von Polynomen zweiten Grades an einen horizontalen und vertikalen entfalteten Schnitt durch die rekonstruierte räumliche Phasenverteilung (Kapitel 3.5.2).

(iii) Implementierte Algorithmen zur numerischen Rekonstruktion:

- Rekonstruktion der komplexen Objektwelle im Ortsraum (NDRM, Kapitel 2.4.3, Gleichung 2.62),
- Rekonstruktion der komplexen Objektwelle in der Hologrammebene mit der erweiterten Fouriertransformation (eFTM, Kapitel 2.4.4, Gleichung 2.76),
- Rekonstruktion bzw. Propagation der komplexen Objektwelle mit diskreter Fresneltransformation (DFT, Kapitel 2.2.1, Gleichung 2.26),

- Rekonstruktion bzw. Propagation der komplexen Objektwelle mit der Faltungsmethode (CVM, Kapitel 2.2.2, Gleichung 2.37).

(iv) Digitale Bildverarbeitung:

- Berechnung der räumlichen Amplituden- und Phasenverteilung der rekonstruierten komplexen Objektwelle,
- Filterung der räumlichen Amplituden- und Phasenverteilung (Kapitel 3.3),
- Entfalten der räumlichen Phasenverteilung (Kapitel 3.4),
- Pseudo-3D-Darstellung der entfalteten räumlichen Phasenverteilung.

(v) Speicherung der räumlichen Amplituden- und Phasenverteilung auf der Festplatte des Computers im BMP-Format.

Für eine komfortable Bedienung wurde zusätzlich eine grafische Benutzeroberfläche entwickelt, die die Bedienung der wichtigsten Funktionen des Programmes über eine Windows-Oberfläche ermöglicht. Ein „Screenshot“ der Software ist in Abbildung A.3 dargestellt.

„On-line“ Rekonstruktion der Objektwelle

Im Rahmen einer Diplomarbeit am Labor für Biophysik [104] wurde u. a. das Programm `FIREVIEW.EXE` zur Bildaufnahme für Kameras mit IEEE1394 Schnittstelle entwickelt. Das Programm ermöglicht darüber hinaus den Zugriff auf die durch den Kameratreiber zur Verfügung gestellten Funktionen, z. B. Einstellung der Belichtungszeit, Bildwiederholrate etc. Die Benutzeroberfläche der Software ist in Abbildung A.4 dargestellt. Durch die Integration einer Schnittstelle zur Zwischenablage von Microsoft Windows wird eine on-line Darstellung der mit dem Programm `REK.PRO` rekonstruierten räumlichen Amplituden- und Phasenverteilungen möglich. Der Datenfluss ist im Folgenden skizziert:

- (i) Aufnahme des Hologramms mit einer CCD-Kamera,
- (ii) Übertragen des digitalisierten Hologramms über die IEEE1394 Schnittstelle an den Computer,
- (iii) Steuerung der CCD-Kamera und Darstellung des digitalen Hologramms auf einem Monitor mit `FIREVIEW.EXE`,
- (iv) Kopieren des digitalen Hologramms in die Zwischenablage von Microsoft Windows mit `FIREVIEW.EXE`,

ANHANG

- (v) Einfügen des digitalen Hologramms aus der Zwischenablage mit dem Programm REK.PRO,
- (vi) Rekonstruktion der Objektwelle mit REK.PRO,
- (vii) Darstellung der rekonstruierten räumlichen Amplituden- und Phasenverteilung auf dem Computermonitor mit REK.PRO.

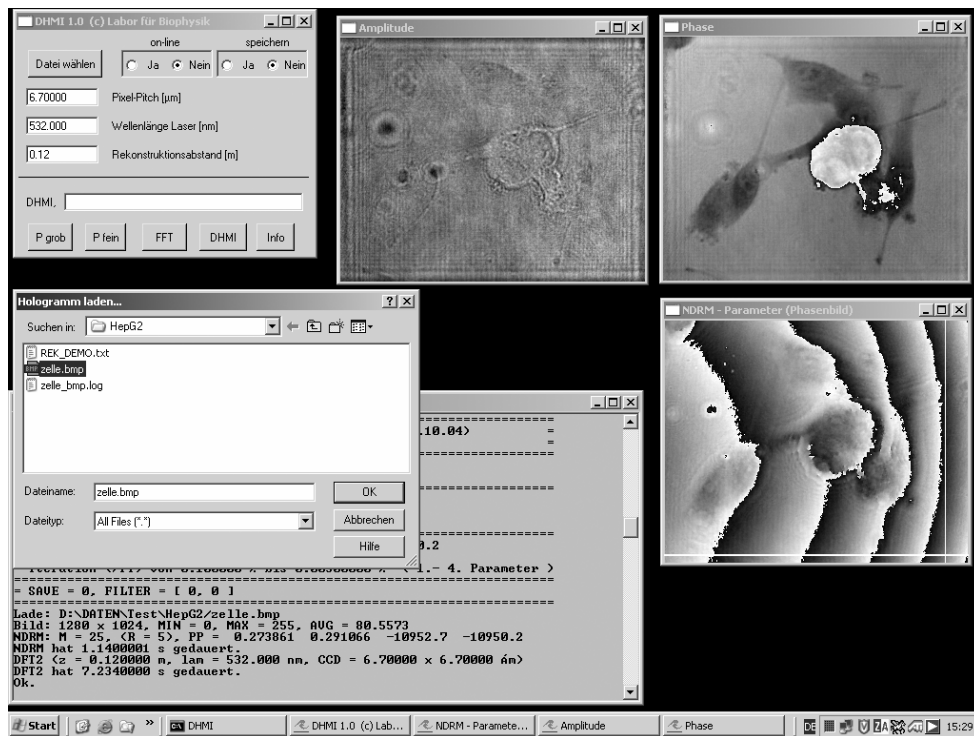


Abbildung A.3: Benutzeroberfläche der Software zur numerischen Rekonstruktion.

ANHANG

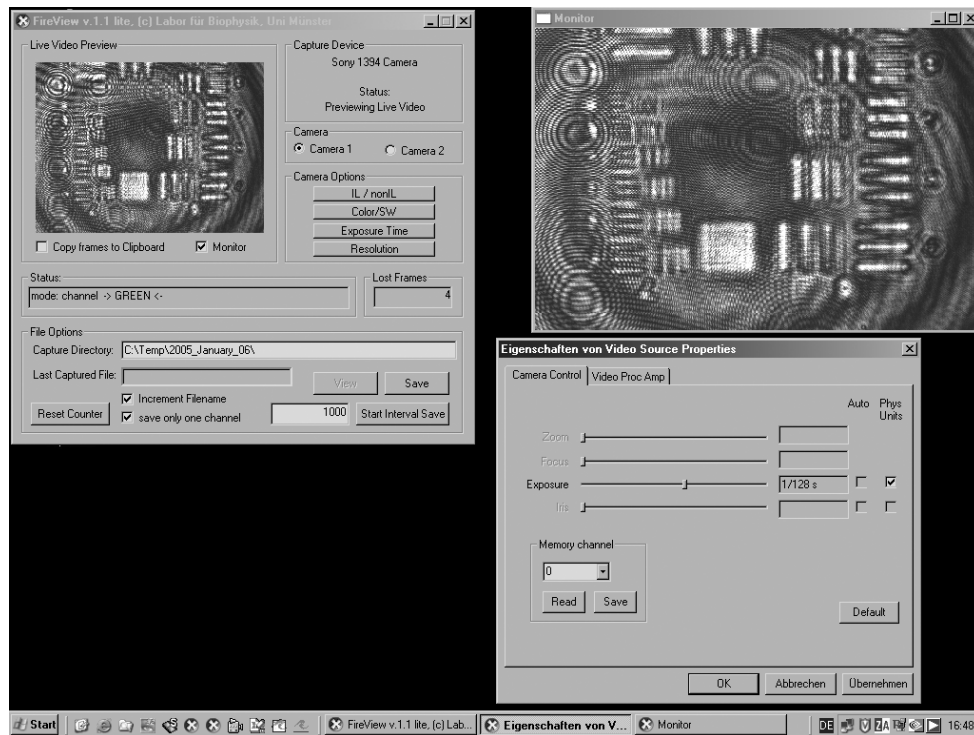


Abbildung A.4: Benutzeroberfläche der Software FIREVIEW.EXE zur Steuerung von CCD-Kameras mit IEEE1394 Schnittstelle.

Literaturverzeichnis

- [1] GABOR, D.: A New Microscopic Principle. In: *Nature* 4098 (1948), S. 777 – 778
- [2] LEITH, E. N. ; UPATNIEKS, J.: Reconstructed Wavefronts and Communication Theory. In: *Journ. Opt. Soc. Amer.* 52 (1962), S. 1123–1130
- [3] LEITH, E. N. ; UPARNIEKS, J.: Wavefront Reconstruction with Continuous-Tone Objects. In: *Journ. Opt. Soc. Amer.* 53 (1963), S. 1377–1381
- [4] LEITH, E. N. ; UPATNIEKS, J.: Wavefront Reconstruction with Diffused Illumination and Three-Dimensional Objects. In: *Journ. Opt. Soc. Amer.* 54 (1964), S. 1295–1301
- [5] POWELL, R. L. ; STETSON, K. A.: Interferometric Vibration Analysis by Wavefront Reconstruction. In: *Journ. Opt. Soc. Amer.* 55 (1965), S. 1593–1608
- [6] BJELKHAGEN, H. I.: *Silver-Halide Recording Materials for Holography and Their Processing*. Springer, Berlin, 1998
- [7] JEONG, T. H. ; BJELKHAGEN, H. I.: *Practical Holography: Materials and Applications: XIX*. Proceedings of SPIE, 2005
- [8] RASTOGI, P. K.: *Holographic Interferometry*. Springer-Verlag, 1994
- [9] SMITH, H. M.: *Holographic Recording Materials*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1977
- [10] CAULFIELD, H. J. ; LU, Sun: *The Applications of Holography*. Wiley-Interscience, 1970
- [11] SCHNARS, U.: Direct Phase Determination in Hologram Interferometry with Use of Digitally Recorded Holograms. In: *J. Opt. Soc. Am. A* 11 (1994), Nr. 7, S. 2011 –2015

- [12] CUCHE, E. ; RUFFIEUX, P. ; POSCIO, P. ; DEPEURSINGE, C.: Phase Contrast Microscopy with Digital Holography. In: *OSA TOPS* 21 (1998), S. 341–344
- [13] CUCHE, E. ; MARQUET, P. ; DEPEURSINGE, C.: Simultaneous Amplitude-Contrast and Quantitative Phase-Contrast Microscopy by Numerical Reconstruction of Fresnel Off-Axis Holograms. In: *Appl. Opt.* 38 (1999), Nr. 24, S. 6694 – 7001
- [14] CUCHE, E. ; MARQUET, P. ; MAGISTRETTI, P. J. ; DEPEURSINGE, C.: Quantitative Phase Contrast Microscopy of Living Cells Ba Numerical Reconstruction of Digital Holograms. In: *Proc. SPIE* 3604 (1999), S. 84 – 89
- [15] CUCHE, E. ; MARQUET, P. ; DEPEURSINGE, C.: Simultaneous Amplitude-Contrast and Quantitative Phase-Contrast Microscopy by Numerical Reconstruction of Fresnel Off-Axis Holograms. In: *Appl. Opt.* 38 (1999), Nr. 34, S. 6994–7001
- [16] LIEBLING, M. ; BLU, T. ; CUCHE, E. ; MARQUET, P. ; DEPEURSINGE, C. ; UNSER, M.: A Novel Non-Diffractive Reconstruction Method for Digital Holographic Microscopy. In: *Proc. of IEEE* (2002), S. 625 – 628
- [17] ONURAL, L. ; SCOTT, P. D.: Digital Decoding of in-Line Holograms. In: *Opt. Eng.* 26 (1987), Nr. 11, S. 1124 – 1132
- [18] PEDRINI, G. ; FRÖNING, P. ; FESSLER, H. ; TIZIANI, H. J.: In-Line Digital Holographic Interferometry. In: *Appl. Opt.* 37 (1998), Nr. 26, S. 6262 – 6269
- [19] LAI, S. ; KEMPER, B. ; BALLY, G. von: Off-Axis Rekonstruktion of in-Line Holograms for Twin-Image Elimination. In: *Opt. Commun.* 169 (1999), S. 37 – 43
- [20] XU, W. ; JERICO, M. H. ; MEINERTZHAGEN, I. A. ; KREUZER, H. J.: Digital in-Line Holography for Biological Applications. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001), S. 11301 – 11305
- [21] COËTMELLE, S. ; C-BURAGA-LEFEBVRE ; LEBRUN, D. ; ÖZKUL, C.: Application of in-Line Digital Holography to Multiple Plane Velocimetry. In: *Meas. Sci. Technol.* 12 (2001), S. 1392 – 1397
- [22] XU, W. ; JERICO, M. H. ; MEINERTZHAGEN, I. A. ; KREUZER, H. J.: Digital in-Line Holography of Microspheres. In: *Appl. Opt.* 41 (2002), Nr. 25, S. 5367 – 5375

- [23] ZHANG, Y. ; PEDRINI, G. ; OSTEN, W. ; TIZIANI, H. J.: Image Reconstruction for in-Line Holography with the Yang-Gu Algorithm. In: *Appl. Opt.* 42 (2003), Nr. 32, S. 6452 – 6457
- [24] DEMETRAKOPOULOS, T. ; MITTRA, R.: Digital and Optical Reconstruction of Images from Suboptical Diffraction Patterns. In: *Appl. Opt.* 13 (1974), S. 665–670
- [25] KREIS, T. M. ; ADAMS, M. ; JÜPTNER, W. P. O.: Methods of Digital Holography: A Comparison. In: *Proc. SPIE* 3098 (1997), S. 224 – 233
- [26] KREIS, T. M. ; JÜPTNER, W. P. O. ; GELDMACHER, J.: Principles of Digital Holographic Interferometry. In: *Proc. SPIE* 3478 (1998), S. 45 – 54
- [27] KREIS, T. M. ; JÜPTNER, W. P. O. ; GELDMACHER, J.: Digital Holography: Methods and Applications. In: *Proc. SPIE* 3407 (1998), S. 169 – 177
- [28] MAS, D. ; GARCIA, J. ; FERREIRA, C. ; BERNARDO, L. M. ; MARINHO, F.: Fast Algorithms for Free-Space Diffraction Patterns Calculation. In: *Opt. Comm.* 164 (1999), S. 233–245
- [29] LIEBLING, M. ; BLU, T. ; UNSER, M.: Complex-Wave Retrieval from a Single Off-Axis Hologram. In: *J. Opt. Soc. Am. A* 21 (2004), Nr. 3, S. 367–377
- [30] PEDRINI, G. ; PFISTER, B. ; TIZIANI, H.: Double Pulse-Electronic Speckle Interferometry. In: *J. Mod. Opt.* 40 (1993), S. 89 – 96
- [31] PEDRINI, G. ; TIZIANI, H. J.: Double-Pulse Electronic Speckle Interferometry for Vibration Analysis. In: *Appl. Opt.* 33 (1994), Nr. 34, S. 7857 – 7863
- [32] PEDRINI, G. ; TIZIANI, H. J.: Digital Double-Pulse Holographic Interferometry Using Fresnel and Image Plane Holograms. In: *Measurement* 15 (1995), S. 251 – 260
- [33] BOTHE, T. ; BURKE, J. ; HELMERS, H.: Spatial Phase Shifting in Electronic Speckle Pattern Interferometry: Minimization of Phase Reconstruction Errors. In: *Appl. Opt.* 36 (1997), Nr. 22, S. 5310 – 5316
- [34] BURKE, J. ; HELMERS, H. ; KUNZE, C. ; WILKENS, V.: Speckle Intensity and Phase Gradients: Influence on Fringe Quality in Spatial Phase Shifting ESPI-Systems. In: *Opt. Commun.* 152 (1998), S. 144 – 152

- [35] BURKE, J. ; HELMERS, H.: Spatial versus Temporal Phase Shifting in Electronic Speckle-Pattern Interferometry: Noise Comparison in Phase Maps. In: *Appl. Opt.* 39 (2000), Nr. 25, S. 4598 – 4606
- [36] KEMPER, B. ; DIRKSEN, D. ; AVENHAUS, W. ; MERKER, A. ; BALLY, G. von: Endoscopic Double-Pulse Electronic-Speckle-Pattern Interferometer for Technical and Medical Intracavity Inspection. In: *Appl. Opt.* 39 (2000), Nr. 22, S. 3899 – 3905
- [37] KEMPER, B. ; KANDULLA, J. ; DIRKSEN, D. ; BALLY, G. von: Optimization of Spatial Phase Shifting in Endoscopic Electronic Speckle Pattern Interferometry. In: *Opt. Commun.* 217 (2003), S. 151– 160
- [38] PLUTA, M.: *Non-Standard Techniques for Phase Contrast Microscopy*. Bd. 6 of Advances in Optical and Electron Microscopy. Academic Press, London and New York, 1975
- [39] PLUTA, M.: Nomarski's DIC Microscopy: A Review. In: *Proc. SPIE* 1846 (1992), S. 10–25
- [40] GLEYZES, P. ; BOCCARA, A. C. ; SAINT-JAIMES, H.: Multichannel Nomarski Microscope with Polarization Modulation: Performances and Applications. In: *Opt. Lett.* 22 (1997), S. 1529–1531
- [41] MINSKY, M.: *Microscopy Apparatus*. US Patent 3013467, 1961
- [42] MINSKY, M.: Memoir on Invention the Confocal Scanning Microscope. In: *Scanning* 10 (1988), S. 128–138
- [43] SHEPPARD, C. ; SHOTTON, D.: *Confocal Laser Scanning Microscopy*. BIOS Scientific Publishers, 1997
- [44] BINNING, G. ; QUATE, C. F. ; GERBER, C.: Atomic Force Microscope. In: *Phys. Rev. Lett.* 56 (1986), S. 930–933
- [45] SVITKINA, T. M. ; VERKHOVSKY, A. B. ; BORISY, G. G.: Improved Procedures for Electron Microscopic Visualization of the Cytoskeleton of Cultured Cells. In: *J. Struct. Biol.* 115 (1995), S. 290–303
- [46] HELMERS, H. ; CARL, D. ; SIEVERS, T.: CMOS-ESPI-System with in-Line Digital Phase Stabilization Using Unresolved Speckles. In: *Proc. SPIE* 4777 (2002), S. 232 – 242
- [47] LAUTERBORN, W. ; KURZ, T.: *Coherent Optics*. 2nd. Springer, Berlin, 2003

- [48] CREATH, K.: Temporal Phase Measurement Methods. In: *Interferogram Analysis*. Bristol : Institute of Physics Publishing, 1993, S. 94 – 140
- [49] VOGEL, H.: *Gerthsen Physik*. 19. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1997
- [50] GOODMAN, J. W.: *Introduction to Fourier Optics*. 2nd. McGraw-Hill, 1996
- [51] SALEH, Bahaa E. A. ; TEICH, Malvin C.: *Fundamentals of Photonics*. John Wiley and Sons, Inc., 1991
- [52] KREIS, T. ; JÜPTNER, W. (Hrsg.) ; OSTEN, W. (Hrsg.): *Akademie Verlag Series in Optical Metrology*. Bd. 1: *Holographic Interferometry: Principles and Methods*. Akademie-Verlag, 1996
- [53] LÜKE, H. D.: *Signalübertragung*. 4. Springer-Verlag, 1990
- [54] GOODMAN, J. W.: Properties of Laser Speckle. In: DAINITY, J. C. (Hrsg.): *Laser Speckle and Related Phenomena*. Springer-Verlag, 1975, S. 9 – 75
- [55] DEPEURSINGE, C. ; CUCHE, E. ; COLOMB, T. ; MASSATSCH, P. ; MARIAN, A. ; MONTFORT, F. ; MARQUET, P. ; MAGISTRETTI, P. J.: Digital Holographic Microscopy Applied to Biological Cells Observation. In: *European Microscopy Society Yearbook* (2003)
- [56] BURKE, J.: *Application and Optimization of the Spatial Phase Shifting Technique in Digital Speckle Interferometry*, Dissertation an der Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg, FB Physik eingereicht, Diss., 2000
- [57] JONES, R. ; WYKES, C.: *Holographic and Speckle Interferometry - A Discussion of the Theory, Practice and Application of the Techniques*. Cambridge University Press, 1983
- [58] WAGNER, C. ; SEEBACHER, S. ; OSTEN, W. ; JÜPTNER, W. P. O.: Digital Recording and Numerical Reconstruction of Lensless Fourier Holograms in Optical Metrology. In: *Appl. Opt.* 38 (1999), Nr. 22, S. 4812 – 4820
- [59] CUCHE, E. ; BAVILACQUA, F. ; DEPEURSINGE, C.: Digital Holography for Quantitative Phase-Contrast Imaging. In: *Opt. Lett.* 24 (1999), Nr. 5, S. 291–293
- [60] GOODMAN, J. W.: *Introduction to Fourier Optics*. McGraw-Hill, San Francisco, 1968

- [61] GRILLI, S. ; FERRARO, P. ; NICOLA, S. de ; FINIZIO, A. ; PIERATTINI, G. ; MEUCCI, R.: Whole Optical Wavefield Reconstruction by Digital Holography. In: *Opt. Express* 9 (2001), Nr. 6, S. 294–302
- [62] SCHNARS, U. ; JÜPTNER, W. P. O.: *Digital Holography*. Springer, 2005
- [63] HADDAD, W. S. ; CULLEN, D. ; SOLEM, J. C. ; LONWORTH, J. W. ; MCPHERSON, A. ; BOYER, K. ; RHODES, C. K.: Fourier-Transform Holographic Microscope. In: *Proc. SPIE* 1448 (1991), S. 81 – 88
- [64] TAKAKI, Y. ; OHZU, H.: Fast Numerical Reconstruction Technique for High-Resolution Hybrid Holographic Microscopy. In: *Appl. Opt.* 38 (1999), Nr. 11, S. 2204 – 2211
- [65] YAMAGUCHI, I. ; KATO, J.-I. ; OHTA, S. ; MIZUNO, J.: Image Formation in Phase-Shifting Digital Holography and Applications to Microscopy. In: *Appl. Opt.* 40 (2001), Nr. 34, S. 6177 – 6186
- [66] GUSTAFSSON, M. ; SEBESTA, M. ; BENGTSSON, B. ; PETTERSSON, S. G. ; EGELBERG, P. ; LENART, T.: High-Resolution Digital Transmission Microscopy - a Fourier Holography Approach. In: *Opt. Lasers Eng.* 41 (2004), S. 553 – 563
- [67] BERGMANN, L. ; SCHAEFER, C.: *Optics*. de Gruyter, 1999
- [68] XU, L. ; PENG, X. ; MIAO, J. ; ASUNDI, A. K.: Studies of Digital Microscopic Holography with Applications to Microstructure Testing. In: *Appl. Opt.* 40 (2001), Nr. 28, S. 5046 – 5051
- [69] INOUÉ, S. ; SPRING, K.: *Video Microscopy: The Fundamentals*. Plenum New York, 1997
- [70] ROBINSON, D. W. ; REID, G. T.: *Interferogramm Analysis*. London: Institute of Physics Publishing Ltd, 1993
- [71] MACY, W. W.: Two-Dimensional Fringe-Pattern Analysis. In: *Appl. Opt.* 24 (1983), S. 3101–3105
- [72] MERTZ, L.: Real-Time Fringe-Pattern Analysis. In: *Appl. Opt.* 22 (1983), Nr. 10, S. 1535 – 1539
- [73] WOMACK, K. H.: Interferometric Phase Measurement Using Spatial Synchronous Detection. In: *Opt. Eng.* 23 (1984), S. 391–395

- [74] CREATH, K. ; SCHMIT, J.: N-Point Spatial Phase-Measurement Techniques for Non-Destructive Testing. In: *Opt. Lasers Eng.* 24 (1996), S. 365–379
- [75] SCHMIT, J. ; CREATH, K.: Window Function Influence on Phase Error in Phase-Shifting Algorithms. In: *Appl. Opt.* 35 (1996), S. 5642–5649
- [76] KEMPER, B.: *Untersuchungen zur endoskopischen Elektronischen Speckle-muster-Interferometrie sowie deren Anwendung an biologischen Objekten*, Dissertaion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin eingereicht, Diss., 2001
- [77] HACKBUSCH, W. ; SCHWARZ, H. R. ; ZEIDLER, E.: *Teubner - Taschenbuch der Mathematik*. B. G. Teubner Stuttgart, Leipzig, 1996
- [78] FRICKE-BEGEMANN, T. ; BURKE, J.: Speckle Interferometry: Three-Dimensional Deformation Field Measurement with a Single Interferogramm. In: *Appl. Opt.* 40 (2001), Nr. 28, S. 5011–5022
- [79] JARAD, A. E. ; GÜLKER, G. ; HINSCH, K. D.: Microscopic ESPI: Using Fourier Transform Method for Better Fringe Quality. In: *Proc. SPIE* 4933 (2003), S. 335–341
- [80] PEDRINI, G. ; SCHEDIN, S. ; TIZIANI, H. J.: Spatial Filtering in Digital Holographic Microscopy. In: *J. Mod. Opt.* 47 (2000), Nr. 8, S. 1447 – 1454
- [81] CUCHE, E. ; MARQUET, P. ; DEPEURSINGE, C.: Spatial Filtering for Zero-Order and Twin-Image Elimination in Digital Off-Axis Holography. In: *Appl. Opt.* 39 (2000), Nr. 23, S. 4070–4075
- [82] CARL, D. ; KEMPER, B. ; WERNICKE, G. ; BALLY, G. v.: Parameter-Optimized Digital Holographic Microscope for High-Resolution Living-Cell Analysis. In: *Appl. Opt.* 43 (2004), Nr. 36, S. 6536–6544
- [83] MURPHY, D. B.: *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. Wiley-Liss, 2001
- [84] ROBENEK, Horst: *Mikroskopie in Forschung und Praxis*. Darmstadt : GIT Verlag, 1995
- [85] CUCHE, E. ; POSCIO, P. ; DEPEURSINGE, C.: Numerical Holography with Digital Recording Devices. In: *Proc. SPIE* 3196 (1998), S. 24 – 30
- [86] BIAESCH-WIEBKE, C.: *Videosysteme*. Vogel-Verlag, 1991

- [87] KNOP, K. ; GÖPEL, W. (Hrsg.) ; HESSE, J. (Hrsg.) ; ZEMEL, J. N. (Hrsg.): *Image Sensors*. VCH-Verlag, 1992 (Sensors, Vol. 6). – 233 – 235 S
- [88] SCHMIDT, U.: *Digitale Videotechnik*. Franzis-Verlag, 1996
- [89] AEBISCHER, H. A. ; WALDNER, S.: A Simple and Effective Method for Filtering Speckle-Interferometric Phase Fringe Patterns. In: *Opt. Commun.* 162 (1999), S. 205 – 210
- [90] HUANG, T. S.: *Topics in Applied Physics Volume 6, Picture Processing and Digital Filtering*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1979
- [91] GONZALEZ, R. C. ; WOODS, R. E.: *Digital Image Processing*. Prentice Hall, 2003
- [92] VROOMAN, H. A. ; MAAS, A. A. M.: Image Processing Algorithms for the Analysis of Phaseshifted Speckle Interference Patterns. In: *Appl. Opt.* 30 (1991), Nr. 13, S. 1636 – 1641
- [93] PSCHYREMBEL: *Klinisches Wörterbuch*. Berlin New York : Walter de Gruyter, 1998
- [94] HELMERS, H. ; SCHELLENBERG, M.: CMOS versus CCD Sensors in Speckle Interferometry. In: *Opt. Laser Technol.* 35 (2003), S. 587–595
- [95] ALBERTS, B. ; BRAY, D. ; LEWIS, J. ; JAENICKE, L.: *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH, 1990
- [96] ELSÄSSER, H. P. ; LEHR, U. ; AGRICOLA, B. ; KERN, H. F.: Establishment and Characterisation of Two Cell Lines with Different Grade of Differentiation Derived from One Primary Human Pancreatic Adenocarcinoma. In: *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 61 (1992), Nr. 5, S. 295–306
- [97] SCHNEKENBURGER, J. ; BREDEBUSCH, I. ; LERCH, M. M. ; DOMSCHKE, W.: Different Functions of E-Cadherin in the Metastasis of Pancreas Tumor Cells. In: *Pancreatology* (2003), S. 435
- [98] SPECTOR, I. ; SHOCHET, N. R. ; KASHMAN, Y. ; GROWEISS, A.: Latrunculins: Novel Marine Toxins That Disrupt Microfilament Organization in Cultured Cells. In: *Science* 219 (1983), Nr. 4584, S. 493–495
- [99] SPECTOR, I. ; SHOCHET, N. R. ; BLASBERGER, D. ; KASHMAN, Y.: Latrunculins - Novel Marine Macrolides That Disrupt Microfilament Organization and Affect Cell Growth: I. Comparison with Cytochalasin D. In: *Cell Motil. Cytoskeleton* 13 (1989), Nr. 3, S. 127–144

- [100] BEUTHAN, J. ; MINET, O. ; HELFMANN, J. ; HERRIG, M. ; MÜLLER, G.: The Spatial Variation of the Refractive Index in Biological Cells. In: *Phys. Med. Biol.* 41 (1996), S. 369–382
- [101] PLATTER, H. ; HENTSCHEL, J.: *Taschenlehrbuch Zellbiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1997
- [102] KRONROD, M. A. ; MERZLYAKOV, N. S. ; YAROSLAVSKII, L. P.: Reconstruction of a Hologram with a Computer. In: *Soviet Physics - Technical Physics* (1971), S. 333–334
- [103] KREIS, T. M. ; JÜPTNER, W. O. P.: Suppression of the DC Term in Digital Holography. In: *Opt. Eng.* 36 (1997), Nr. 8, S. 2357 – 2360
- [104] BISCHOFF, G.: *Einsatz von Firewire-Farbkameras bei der Elektronischen Specklemuster Interferometrie (ESPI)*, Diplomarbeit am Labor für Biophysik, Universität Münster, Diplomarbeit, 2003

Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

H. Helmers, D. Carl, T. Sievers, Interferometry XI: Techniques and Analysis, 8.7. - 10.7.2002, Seattle: „CMOS-ESPI-system with in-line digital phase stabilization using unresolved speckles“, *SPIE* **4777**, 232-241 (2002).

B. Kemper, D. Carl, S. Knoche, R. Thien, G. von Bally, „Holographic interferometric microscopy systems for the application on biological samples“, Proceeding of the international Conference Photonics Europe, 26.-30. April 2004, *SPIE* **5457**.

D. Carl, A. Höink, C. Denz, G. von Bally, „Digital Holographic Microscope for the Analysis of Living Cells“, 105. Annual meeting DGaO, 1.6.-5.6. 2004, Bad Kreuznach, *Proc. DGaO* 2004 (1. Preis Posterwettbewerb).

D. Carl, B. Kemper, G. von Bally, „Digital Holographic Microscope for Living Cell Analysis“, International Symposium on Cellular Engineering and Nanosensors, 38. Annual Congress on Biomedical Engineering, BMT 2004, 21.9.2004, *Proc. BMT* **49**, Extension Part 2, 978-979.

D. Carl, B. Kemper, G. Wernicke, G. von Bally, „Parameter Optimized Digital Holographic Microscope for High Resolution Living Cell Analysis“, *Appl. Opt.* **43**, 6536-6544 (2004).

D. Carl, B. Kemper, G. von Bally, „Hochauflösendes modulares digitalholographisches Mikroskopiesystem zur dynamischen quantitativen 3D-Lebendzell-Analyse“, *InnovationsForum Photonik - 2005 Biophotonik*, Veranstalter: Photonic Net, TU Clausthal, Firma Stöbich, Goslar 2005 (Gewinner des Preises zum Kaiser-Friedrich-Posterwettbewerb).

D. Carl, A. Höink, B. Kemper, J. Schnekenburger, G. von Bally, „Digital holographic multi-focus quantitative phase contrast microscopy“, 106. Annual meeting DGaO, 17.5.-21.5. 2005, Wroclaw, Polen, *Proc. DGaO* 2005.

B. Kemper, D. Carl, J. Schnekenburger, I. Bredebusch, M. Schäfer, W. Domschke, G. von Bally, „Investigations on Living Pancreas Tumor Cells by Digital Holographic Microscopy“, *J. Biomed. Opt.* (accepted 2006).

G. von Bally, B. Kemper, D. Carl, „Nano-interferometrische holographische Messtechnik für Medizin, Life Sciences und Biophotonik“, Symposium Nanoanalytik: Neue Perspektiven für die Zellbiologie, 27.-28.6.2005, Münster.

J. Schnekenburger, D. Carl, B. Kemper, „Dynamische Analyse der Zellmorphologie mit digitaler Holographie“, BIOforum 12/2005, S. 42-44, GIT VERLAG GmbH & Co. KG, Darmstadt, www.gitverlag.com, www.pro-4-pro.com.

Abkürzungsverzeichnis

REM	Raster-Elektronen-Mikroskopie
AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl. „Atomic Force Microscopy“)
NA	Numerische Apertur
DOF	Schärfentiefe (engl. „Depth of Field“)
TPS	Zeitliches Phasenschieben (engl. „Temporal Phase Shifting“)
SPS	Räumliches Phasenschieben (engl. „Spatial Phase Shifting“)
FFT	Schnelle Fouriertransformation (engl. „Fast Fourier Transformation“)
DFT	Diskrete Fresneltransformation
CVM	Faltungsmethode (engl. „Convolution Method“)
NDRM	Methode zur nicht-beugenden Rekonstruktion im Ortsraum (engl. „Non-Diffractive Reconstruction Method“)
FTM	Fouriertransformationsmethode
eFTM	erweiterte Fouriertransformationsmethode
KKF	Kreuz-Korrelations-Funktion
PaTu 8988S	humane Pankreas-Tumor-Zelllinie (hoch differenziert)
PaTu 8988T	humane Pankreas-Tumor-Zelllinie (niedrig differenziert)
PaTu 8988T pLXIN	humane Pankreas-Tumor-Zelllinie (durch viral vermittelten Gentransfer verändert)
E-Cadherin	
b. E.	beliebige Einheiten
o. E.	ohne Einheit

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mein Studium und die Vollen-
dung meiner Promotion ermöglicht haben. Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr.
Günther Wernicke für die externe Betreuung meiner Doktorarbeit. Herrn Prof. Dr.
Klaus Hinsch und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Angewandte Optik der Carl
von Ossietzky Universität Oldenburg danke ich für die fachliche Unterstützung
meiner Arbeit und die gute Ausbildung während meiner Diplomarbeit. Bei Herrn
Prof. h.c. (Acad. Sci. UA) Gert von Bally möchte ich mich für die Anstellung
als Wiss. Mitarbeiter in seiner Arbeitsgruppe am Labor für Biophysik der West-
fälischen Wilhelms-Universität Münster, die Bereitstellung eines sehr gut ausge-
statteten Labors und das Vertrauen, mit dem er meine Arbeit stets unterstützt hat,
bedanken.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe des Labors für Biophysik danke ich für
die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Herrn Dr. Björn
Kemper und Herrn Patrik Langehanenberg danke ich für die ständige Bereitschaft
zu Fachdiskussionen und für zahlreiche Anregungen mit denen sie meine Arbeit
unterstützt haben. Bei Herrn Alexander Höink bedanke ich mich für die im Rah-
men seiner Diplomarbeit durchgeführten Messungen. Für die Entwicklung der
Software zur Bildaufnahme mit IEEE1394 Kameras danke ich Herrn Dipl. Ing.
Guido Bischoff.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. Jürgen Schnekenburger (Universi-
tätsklinikum Münster, Medizinische Klinik und Poliklinik B, Labor für Gastroen-
terologische Molekulare Zellbiologie) für die gute interdisziplinäre Zusammen-
arbeit bei der digitalholographisch mikroskopischen Untersuchung von Pankreas-
Tumor-Zellen. Mit viel Engagement und großem zeitlichen Aufwand hat er da-
zu beigetragen mir zellbiologische Fragestellungen und die daraus resultierenden
Anforderungen an das Messverfahren näher zu bringen.

Für die Unterstützung der experimentellen Arbeiten an biologischen Objekten
danke ich weiterhin Frau M. Volkmann (Institut für Strahlenbiologie, WWU
Münster), Frau Dipl. Biol. Monika Stich und Frau Dr. Andrea Buchstaller (Firma
P.A.L.M. Microlaser Technologies Bernried) und Prof. Donald Martin (Univer-
sity of Technology Sydney). Ich möchte mich außerdem bei Herrn Dr. Christian

Dietrich und Herrn Dr. Michael Kempe (Carl Zeiss Jena GmbH) für zahlreiche kritische Diskussionen, die meine Arbeiten stets vorangetrieben haben, die Bereitstellung von technischen Proben und die Kooperation beim Demonstratoraufbau bedanken.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und den Firmen Carl Zeiss Jena GmbH und der Firma P.A.L.M Microlaser Technologies Bernried danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Verbundprojektes: „Mikrointerferometrische optische Sonden zur Zellfunktionsanalyse und Zellmanipulation (MIKROSO)“.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meiner Ehefrau Birgit, und meinen Freunden für das Verständnis und die moralische Unterstützung für meine Arbeit bedanken.

Lebenslauf



Name:	Daniel Carl
Anschrift:	Josefine-Mauser-Str. 56, D-48157 Münster
E-Mail:	d.carl@web.de
Geburtstag u. -ort:	13.02.1976, Jena
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet
Ehefrau:	Birgit Carl, geb. Goldenstedt
Eltern:	Constanze Carl, geb. Ditzel und Bernd Carl

Schulbildung

09/1982 - 06/1989	Politechnische Oberschule Karl Liebknecht Jena
09/1989 - 06/1996	Neues Gymnasium Oldenburg
15.06.1996	Abitur
06/1996 - 07/1997	Zivildienst bei der Johanniter-Unfall-Hilfe e.V. in Oldenburg

Studium

10/1997 - 09/2002	Physik an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
24.09.2002	Physik Diplom
10/2002 - 12/2005	Promotion im Fach Physik an der Humboldt-Universität zu Berlin
19.12.2005	Disputation (akademischer Grad: Dr. rer. nat.)

Berufliche Tätigkeit

10/2002 - 11/2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Labor für Biophysik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
seit 11/2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fraunhofer-Institut für Physikalische Messtechnik IPM in Freiburg

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt zu haben. Ich habe alle benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben.

Münster, 5. September 2005

Daniel Carl